

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Preventivní medicína



**MUDr. Jiří Hlušíčka**

**PROSPEKTIVNÍ STUDIE ROLE OXIDAČNÍHO  
STRESU U AKUTNÍCH INTOXIKACÍ METANOLEM**

**Prospective study of the role of oxidative stress in acute methanol  
poisonings**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Školitel: doc. MUDr. Sergej Zacharov, Ph.D., FEAPCCT

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 10. 01. 2020

JIŘÍ HLUŠIČKA

Podpis

### **Identifikační záznam**

HLUŠIČKA, Jiří. *Prospektivní studie role oxidačního stresu u akutních intoxikací metanolem. [Prospective study of the role of oxidative stress in acute methanol poisonings]*.

Praha, 2020.        stran, 5 příloh.

Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika pracovního lékařství 1. LF UK. Školitel: Zacharov, Sergej.

## ABSTRAKT

**Kontext:** Akutní intoxikace metanolem ohrožuje člověka na životě. Metanol se v organismu metabolizuje na formaldehyd a kyselinu mravenčí, která inhibuje cytochrom c oxidázu v mitochondriích a tímto se podílí na rozvoji oxidačního stresu.

**Cíl:** Zjistit, jaká je role oxidačního stresu v patogenezi akutního neuronálního poškození centrálního nervového systému (CNS), v rozvoji dlouhodobých následků otravy metanolem a chronických neurodegenerativních procesů v letech následujících po akutní expozici metanolem.

**Materiál a metodika:** Intoxikace metanolem byla potvrzena analyticky u 55 pacientů zařazených do souboru studie, jejich věk v době otravy byl  $46,7 \pm 3,6$  let (9 žen, 46 mužů). Všichni pacienti byli společně s 41 kontrolami vyšetřeni v rámci prospektivní longitudinální kohortové studie. Při příjmu do nemocnice, během hospitalizace a v pravidelných intervalech po propuštění byly pacientům odebírány vzorky krevního séra, ve kterých byly stanovovány koncentrace markerů oxidačního poškození lipidů 4-hydroxy-trans-2-hexenal (HHE), 4-hydroxynonenal (HNE), malondialdehyd (MDA), 8-izoprostan, nukleových kyselin 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG), 8-hydroxyguanosin (8-OHG), 5-(hydroxymethyl)uracil (5-OHMU), proteinů ortho-tyrosin (o-Tyr), nitrotyrosin (NOTyr), chlorotyrosin (Cl-Tyr) a leukotrienů LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>. Pacienti byli dále vyšetřováni  $4,9 \pm 0,6$ ,  $25,0 \pm 0,6$  a  $49,9 \pm 0,5$  měsíců po dimisi z nemocnice. Protokol klinického vyšetření zahrnoval biochemická laboratorní vyšetření, vyšetření oční a neurologické, měření zrakových evokovaných potenciálů (VEP), optickou koherenční tomografii (OCT) s měřením tloušťky vrstvy nervových vláken sítnice (RNFL), magnetické rezonanční vyšetření mozku (MRI) a jeho zpracování volumetrickým softwarem Morphobox.

**Výsledky:** Pacienti s akutní otravou metanolem měli signifikantně vyšší koncentrace markerů lipoperoxidace HHE, HNE, MDA a leukotrienů v periferním krevním séru než přeživší vyšetřovaní dva roky po otravě (všechna  $p < 0,001$ ). Během hospitalizace, pacienti, kteří přežili intoxikaci, měli vyšší akutní koncentrace leukotrienů LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> a markerů lipoperoxidace než zemřelí (všechna  $p < 0,01$ ). Pacienti s toxickým poškozením bazálních ganglií měli relativně nižší akutní sérové koncentrace leukotrienů a markerů lipoperoxidace než ti, kteří přežili otravu bez následků ze strany CNS ( $p < 0,05$ ). Dva roky po propuštění z nemocnice již nebyla přítomna žádná asociace mezi sérovými koncentracemi leukotrienů a markery lipoperoxidace a následky otravy metanolem ze strany CNS.

Pouze jeden ze 3 měřených akutních markerů poškození nukleových kyselin, 8-OHdG, byl signifikantně elevován ve srovnání s následnými koncentracemi ( $p = 0,009$ ). Ze sledovaných akutních markerů oxidačního poškození proteinů byla elevována pouze koncentrace markeru o-Tyr ( $p < 0,001$ ). Při porovnání akutních koncentrací markerů poškození nukleových kyselin a proteinů, pouze koncentrace dvou markerů – 8-OHdG a 8-OHG – byly u přeživších signifikantně vyšší než u zemřelých ( $p < 0,05$ ). Následné sérové koncentrace markerů oxidačního poškození nukleových kyselin a proteinů nekorelovaly s akutně měřenými koncentracemi a s následky otravy ze strany CNS.

Pacienti se známkami toxického poškození mozku na magnetické rezonanci měli signifikantně menší objem putamen, nucleus caudatus a globus pallidus v porovnání s pacienty přeživšími otravu bez následků ( $p < 0,05$ ). Objem bazálních ganglií u přeživších otravu pacientů koreloval s akutní koncentrací leukotrienu LTB<sub>4</sub> ( $p < 0,05$ ) a akutními koncentracemi markerů oxidačního poškození lipidů (MDA, 8-izoprostan) a bílkovin (o-Tyr). Byla prokázána pozitivní korelace mezi objemem bazálních ganglií a tloušťkou nervových vláken sítnice měřených v rámci následných vyšetření.

**Závěr:** Mechanismy oxidačního stresu hrají důležitou roli v patogenezi toxického poškození CNS u pacientů s akutní intoxikací metanolem. Tyto mechanismy mohou mít jak protektivní, tak i destruktivní efekt v závislosti na intenzitě a době trvání akutního oxidačního stresu způsobeného přímým toxickým účinkem kyseliny mravenčí. Interakce mezi časnou lipoperoxidací neuronálních membrán a neuroinflamací zprostředkovanou leukotrieny se podílí na důležitých neuroprotektivních mechanismech. Akutní oxidační poškození nukleových kyselin a proteinů u pacientů přeživších otravu mělo relativně mírný a reverzibilní charakter. Pacienti přeživší otravu s následky toxického poškození mozku měli menší objem bazálních ganglií a menší tloušťku nervových vláken sítnice, přičemž tyto hodnoty pozitivně korelovaly, což charakterizuje OCT RNFL jako vhodnou screeningovou metodu pro včasnou diagnostiku dlouhodobých následků ze strany CNS.

**Klíčová slova:** metanol, intoxikace metanolem, oxidační stres, markery oxidačního stresu, neurologické a zrakové následky otravy metanolem

## ABSTRACT

**Context:** Acute methanol poisoning is a life-threatening condition. Methanol is metabolized in the organism to formaldehyde and then to formic acid, which inhibits cytochrome c oxidase in mitochondria and thus contributes to the development of oxidative stress.

**Aim:** To study the role of oxidative stress in the pathogenesis of acute neuronal damage to the central nervous system (CNS), in the development of long-term sequelae of methanol poisoning and chronic neurodegenerative processes in the years following acute methanol exposure.

**Material and Methods:** Methanol intoxication was confirmed analytically in 55 patients included in the study; their age at the time of poisoning was  $46.7 \pm 3.6$  years (9 females and 46 males). All patients, together with 41 control subjects, were examined in a prospective longitudinal cohort study. At admission, during hospitalisation, and at regular intervals after discharge during the follow-up, the patients were sampled for serum concentrations of lipid oxidative damage markers 4-hydroxy-trans-2-hexenal (HHE), 4-hydroxynonenal (HNE), malondialdehyde (MDA), and 8-isoprostane, for nucleic acids oxidative damage markers 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 8-hydroxyguanosine (8-OHG), 5-(hydroxymethyl) uracil (5-OHMu), for proteins oxidative damage markers ortho-tyrosine (o-Tyr), nitrotyrosine (NOTyr), chlorotyrosine (Cl-Tyr), and for leukotrienes LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, and LTE<sub>4</sub>. The patients were examined  $4.9 \pm 0.6$ ,  $25.0 \pm 0.6$ , and  $49.9 \pm 0.5$  months after discharge. The clinical examination protocol included biochemical laboratory tests, ocular and neurological examinations, visual evoked potential measurements (VEP), optical coherence tomography (OCT) with retinal nerve fibers thickness (RNFL) measurements, magnetic resonance imaging (MRI) of the brain with image processing by volumetric software Morphobox.

**Results:** Patients with acute methanol poisoning had significantly higher concentrations of peripheral blood serum lipoperoxidation markers HHE, HNE, MDA, and leukotrienes than survivors examined two years after poisoning (all  $p < 0.001$ ). During hospitalization, patients who survived intoxication had higher acute leukotrienes concentrations of LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, and lipoperoxidation markers than the deceased subjects (all  $p < 0.01$ ). Patients with toxic damage to basal ganglia had relatively lower acute serum concentrations of leukotrienes and lipoperoxidation markers than those who survived without CNS sequelae ( $p < 0.05$ ). Two years after discharge from the hospital, there was no association between serum leukotrienes concentrations, markers of lipoperoxidation and CNS sequelae of methanol poisoning.

Only one of three measured acute markers of nucleic acids injury, 8-OHdG, was significantly elevated compared to subsequent concentrations ( $p = 0.009$ ). Of observed acute markers of oxidative proteins damage, only o-Tyr concentration was elevated ( $p < 0.001$ ). When comparing acute concentrations of nucleic acids and proteins oxidative damage markers, only the concentrations of two markers - 8-OHdG and 8-OHG - were significantly higher in the survivors than in the deceased ( $p < 0.05$ ). The follow-up serum concentrations of oxidative damage markers of nucleic acids and proteins did not correlate with acutely measured concentrations and CNS sequelae of methanol poisoning.

Patients with the evidence of toxic brain damage on MRI had significantly lower volume of putamen, nucleus caudatus, and globus pallidus compared to the patients without CNS sequelae ( $p < 0.05$ ). Basal ganglia volume in survivors correlated with acute leukotriene LTB<sub>4</sub> concentration ( $p < 0.05$ ) and acute concentrations of markers of oxidative damage of lipids (MDA, 8-isoprostane) and proteins (o-Tyr). Positive correlation was demonstrated between basal ganglia volume and retinal nerve fibers thickness measured within the follow-up examinations.

**Conclusion:** Mechanisms of oxidative stress play an important role in the pathogenesis of toxic CNS damage in patients with acute methanol intoxication. These mechanisms can have both protective and destructive effects depending on the intensity and duration of acute oxidative stress caused by the direct toxic effect of formic acid. The interaction between early neuronal membrane lipoperoxidation and leukotriene-mediated neuroinflammation is involved in important neuroprotective mechanisms. Acute oxidative damage to nucleic acids and proteins in survivors was relatively mild and reversible. Survivors of acute methanol poisoning with sequelae of toxic brain damage had lower volume of the basal ganglia and retinal nerve fibers thickness, and these values correlated positively, demonstrating OCT RNFL as a suitable screening method for early diagnosis of long-term CNS sequelae of methanol poisoning.

**Key words:** methanol, methanol intoxication, oxidative stress, markers of oxidative stress, neurological and visual sequelae of methanol poisoning

## Obsah

ABSTRAKT .....	4
ABSTRACT .....	5
PODĚKOVÁNÍ.....	8
VĚNOVÁNÍ.....	9
ZKRATKY .....	10
1. ÚVOD .....	12
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	14
2.1 Oxidační stres .....	14
2.2 Mechanismus toxického účinku metanolu .....	15
2.3 Klinický obraz otravy metanolem .....	16
2.4 Diagnostika a terapie intoxikace metanolem .....	17
2.5 Toxické poškození mozku a neuroinflamace .....	18
2.6 Peroxidace lipidů buněčných membrán .....	20
2.7 Oxidativní poškození nukleových kyselin a proteinů .....	20
2.8 Preventivní faktory v mechanismech toxického poškození centrálního nervového systému.....	21
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....	23
4. SOUBOR PACIENTŮ A METODIKA.....	24
4.1 Protokol klinického vyšetření.....	27
4.2 Laboratorní vyšetření .....	27
4.3 Analýza dat.....	29
5. VÝSLEDKY A DISKuze .....	30
5.1 Neuroinflamace a lipoperoxidace.....	30
5.1.1 Leukotrieny (Publikace I).....	30
5.1.2 Lipoperoxidace (Publikace II).....	38
5.1.3 Reaktivní karbonylové radikály, karbonylový stres u akutní otravy metanolem (Publikace III) .....	50
5.2 Oxidativní poškození nukleových kyselin a proteinů u akutní otravy metanolem (Publikace IV) .....	54
5.2.1 Akutní sérové koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů a jejich dynamika .....	54
5.2.2 Následné (follow-up) koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů .....	61
5.3 MR-volumetrie jako biomarker prognózy u akutní otravy metanolem.....	64
5.4 Prevence .....	70
6. ZÁVĚR.....	73

6.1 Role neuroinflamace v mechanismech toxického poškození mozku u akutních otrav metanolem .....	73
6.2 Role lipoperoxidace u akutních otrav metanolem.....	73
6.3 Karbonylový stres u akutních otrav metanolem.....	74
6.4 Oxidativní poškození nukleových kyselin a proteinů u akutních otrav metanolem.....	74
6.5 MR volumetrie jako biomarker prognózy akutních intoxikací metanolem .....	74
6.6 Prevence dlouhodobých následků otrav metanolem .....	75
7. LITERATURA.....	76
8. SEZNAM TABULEK.....	86
9. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	87
10. SEZNAM ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ AUTORA .....	88
11. PŘÍLOHY: KOPIE HLAVNÍCH ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ .....	90

11.1 Zakharov, S., Kotikova, K., Nurieva, O., Hlusicka, J., Kacer, P., Urban, P., Vaneckova, M., Seidl, Z., Diblik, P., Kuthan, P. and Navratil, T., 2017. Leukotriene-mediated neuroinflammation, toxic brain damage, and neurodegeneration in acute methanol poisoning. *Clinical Toxicology*, 55(4), pp.249-259.

11.2 Hlusicka, J., Loster, T., Lischkova, L., Vaneckova, M., Seidl, Z., Diblik, P., Kuthan, P., Urban, P., Navratil, T., Kacer, P. and Zakharov, S., 2018. Role of activation of lipid peroxidation in the mechanisms of acute methanol poisoning. *Clinical Toxicology*, 56(10), pp.893-903.

11.3 Hlusicka, J., Loster, T., Lischkova, L., Vaneckova, M., Diblik, P., Urban, P., Navratil, T., Kacer, P., Kacerova, T. and Zakharov, S., 2019. Reactive carbonyl compounds, carbonyl stress, and neuroinflammation in methyl alcohol intoxication. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 150(9), pp.1723-1730.

11.4 Hlusicka, J., Loster, T., Lischkova, L., Vaneckova, M., Diblik, P., Urban, P., Navratil, T., Kacer, P., Kacerova, T. and Zakharov, S., 2019. Markers of nucleic acids and proteins oxidative damage in acute methanol poisoning. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 150(3), pp.477-487

11.5 Hlusicka, J., Mana J., Vaneckova, M., Kotikova, K., Diblik, P., Urban, P., Navratil, T., Marechal, B., Kober, T., Zakharov, S. 2020. MRI-based brain volumetry as a biomarker of outcomes in acute methanol poisoning. *Neurotoxicology* 2020 (submitted).

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych rád poděkoval Toxikologickému informačnímu středisku Kliniky pracovního lékařství VFN a 1. LF UK v Praze za možnost realizace mé vědecké práce. Především chci poděkovat svému školiteli, doc. MUDr. Sergejovi Zacharovovi, Ph.D., za jeho čas, cenné rady a motivaci ve vědecké práci.

Data pro můj výzkum byla získávána a interpretována celou řadou kolegů z různých ústavů a klinik VFN a 1. LF UK v Praze i mimo ně. Další mé poděkování tedy směřuje k prof. Ing. Kačerovi, Ph.D. z výzkumného centra BIOCEV, který společně se svým týmem měřil sérové koncentrace markerů oxidačního stresu ve vzorcích krevního séra od intoxikovaných osob. Dále jsem vděčný kolegům z Neurologické kliniky a Centra klinických neurověd, kolegům z Oční kliniky, Radiodiagnostické kliniky, Adiktologické kliniky, z forenzní toxikologické laboratoře Ústavu soudního lékařství a toxikologie. Rád bych poděkoval všem přednostům jednotlivých klinik a ústavů za to, že na svých pracovištích souhlasili s uskutečněním prospektivní metanolové studie. Kolegům, kteří se přímo podíleli na výzkumu, děkuji za jejich čas, který projektu věnovali. Vím, že to bylo mnohdy mimo pracovní dobu, a proto si jejich entuziasmu nesmírně vážím.

Na Klinice pracovního lékařství bych rád jmenovitě poděkoval prof. Ing. Tomášovi Navrátilovi, Ph.D., který mi vždy ochotně pomáhal s technickou stránkou práce. Dále pak prof. MUDr. Daniele Pelclové, CSc. za podporu a motivaci. V neposlední řadě bych chtěl vyjádřit díky svým kolegům z Toxikologického střediska – MUDr. L. Lischkové, MUDr. M. Regendovi, PharmDr. E. Procházkové, PharmDr. Z. Kolpach, PharmDr. L. Neuschlové za neutuchající podporu a důvěru ve mě.

Děkuji i Ing. Tomáši Lösterovi, Ph.D., matematikovi a statistikovi, který se mnou strávil desítky hodin a pomáhal mi analyzovat a interpretovat získaná data.

Nakonec bych rád poděkoval svým přátelům, rodině a hlavně rodičům, kteří ačkoliv netuší, co postgraduál a věda je, vždy mě podporovali a věřili ve mě.



## VĚNOVÁNÍ

Tuto práci bych rád věnoval všem obětem metanolových otrav po celém světě, jelikož tito lidé byli nuceni zaplatit daň nejvyšší za malou dávku rozveselení v jejich často nenaplněném životě.

**ZKRATKY**

5-OHMU	-	5-hydroxymethyluracil
8-OHdG	-	8-hydroxy-2'-deoxyguanosin
8-OHG	-	8-hydroxyguanosin
AACT	-	Americká akademie klinických toxikologů
ADH	-	Alkoholdehydrogenáza
AG	-	Aniontové okno
ALDH	-	Aldehyddehydrogenáza
APTT	-	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ATP	-	Adenosintriphosphát
BE	-	Přebytek bazí
C6-C12	-	Reaktivní aldehydy C6-C12
Ca	-	Vápník
Cl-Tyr	-	Chlorotyrosin
CNS	-	Centrální nervový systém
CT	-	Výpočetní tomografie
cyt	-	Cytokin
CYP450	-	Cytochom P450
CYP2E1	-	Cytochrom P2E1
ČR	-	Česká republika
DNA	-	Deoxyribonukleová kyselina
EAPCCT	-	Evropská asociace toxikologických středisek a klinických toxikologů
EtOH	-	Etanol
FDH	-	Formaldehyddehydrogenáza
GSH	-	Glutathion
H3COH	-	Metanol
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	Hydrogenuhličitanový aniont
HHE	-	4-hydroxy-trans-2-hexenal
HNE	-	4-hydroxynonenal
IHD	-	Intermitentní hemodialýza
IL	-	Interleukin
INR	-	Mezinárodní normalizovaný poměr
IQR	-	Interquartilové rozpětí
LT	-	Leukotrien
MDA	-	Malondialdehyd
MetOH	-	Metanol
mL	-	mililitr
mmol	-	milimol
MR	-	Magnetická rezonance
MTB	-	Metabolismus
Na	-	Sodík
NK	-	Nukleové kyseliny
NO-Tyr	-	Nitrotyrosin

Nrf2	-	Jaderný erytroidní faktor 2
o-Tyr	-	Ortho-tyrosin
OCT	-	Optická koherenční tomografie
OG	-	Osmolární okno
pg	-	pikogram
RCS	-	Reaktivní karbonylový stres
RNA	-	Ribonukleová kyselina
RNFL	-	Vrstva nervových vláken sítnice
ROS	-	Volné kyslíkové radikály
SOD	-	Superoxiddismutáza
THF	-	Tetrahydrofolát
TSH	-	Thyreotropní hormon
WHO	-	Světová zdravotnická organizace

## 1. ÚVOD

Metanol (metylalkohol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) je nejjednodušší alkohol, jehož molekula se skládá z jedné methylové a jedné hydroxylové skupiny [Fiedler et al., 2000]. Má podobné fyzikálně chemické vlastnosti jako etanol [WHO, 1997]. Jedná se o bezbarvou kapalinu s alkoholovou vůní. Je mísitelný s vodou, etanolem a řadou organických rozpouštědel [WHO, 1997]. Na rozdíl od etanolu metabolity vzniklé při metabolismu metanolu jsou pro člověka velmi toxické [Barceloux et al., 2002]. Metanol byl poprvé izolován v 17. století suchou destilací dřeva zimostrázu [Boyle, 1661]. Dnes se téměř veškerý methanol vyrábí synteticky katalytickou redukcí oxidu uhelnatého za přítomnosti vodíku [WHO, 1997].

Metanol je ubiquiterní látka. Jeho přítomnost byla zjištěna i v atmosféře, kam se dostává činností sopek, hydrotermálních systémů mořského dna, spalováním biomasy a jako emise z rostlin [Williams et al., 2005]. Vzniká v nadzemních částech rostlin, kde je skladován v listech a uvolňován ráno při otevírání listových stomat [Nemecek-Marshall, 1995]. Významným zdrojem „přirozeného“ metanolu je zralé ovoce, kde vzniká anaerobní fermentací, činností alkoholdehydrogenázy [Kimmerer et al., 1987]. Ze stejného důvodu lze detekovat metanol i v alkoholických nápojích – zejména vyráběných ze zkvašeného ovoce [Dorokhov et al., 2014]. Metanol je uvolňován z ovocného pektinu [Bindler et al., 1988]. Nejvyšší koncentrace metanolu byly naměřeny u červených vín ze Španělska a Itálie – až 635 mg/L [Greizerstein, 1981]. Dalším zdrojem exogenního metanolu pro člověka je syntetické sladidlo aspartam, ze kterého se uvolňuje při jeho degradaci. Endogenně vzniká metanol v organismu člověka zejména činností bakterií střevního mikrobiomu [Dorokhov et al., 2014].

Do širšího povědomí se metanol dostal v 19. století, kdy se začal přidávat do obchodních přípravků, byl například používán ve farmacii [Ziegler, 1921]. Ve 20. století s rozvojem chemického a farmaceutického průmyslu bylo metanolu vyráběno čím dál víc a přibývalo i akutních otrav. Na začátku 20. století bylo zdokumentováno 314 případů otrav metanolem ve Spojených státech [Wood, 1905]. Podobné tragédie byly popsány i v Evropě. Avšak laboratorní zvířata na metanol nereagovala příznaky intoxikace, které byly známy u lidí [Røe, 1946]. Toxicita metylalkoholu byla experimentálně potvrzena až v polovině 20. století, kdy byly laboratorní hlodavci nahrazeni primáty s metabolismem metanolu podobným lidskému [Bennett et al., 1953].

V dnešní době se celosvětově vyrábějí miliony galonů metanolu [Barceloux et al., 2002]. Používá se jako rozpouštědlo, biopalivo, meziprodukt při výrobě chemikálií. Najdeme jej také v mnoha přípravcích v domácnosti – nemrznoucí směsi, přísady do benzínu, technické kapaliny atd. [WHO, 1997]. Nelegálně je používán k pančování alkoholu, tzn. k náhradě etanolu lacinějším metanolem. Po konzumaci takto upravených nápojů dochází k hromadným metanolovým otravám [Sejersted et al., 1981].

Od poloviny 20. století je toxicita metanolu detailně objasněna. Hromadné otravy metanolem jsou ale z celosvětového hlediska stále velký problém veřejného zdraví. K většině z nich dochází v rozvojových zemích. Časté jsou ve státech jako Indie [Mohan et al., 2001; Dilip et al., 2013], Indonésie [Giovanetti et al., 2013], Bangladěš [Chowdhury et al., 2014], Irán [Hassanian-Moghaddam et al., 2015], Keňa [Ahmad K, 2000].

Otravy se nevyhnuly ani evropskému kontinentu. V roce 2001 se otrávil 150 lidí v Estonsku [Paasma et al., 2007; 2013], v roce 2002 bylo popsáno 50 případů otrav v Norsku [Hovda et al., 2005]. Rok 2012 je spojen s metanolovou kauzou v České republice, kdy bylo postiženo víc než 120 osob, z toho jich 40 zemřelo [Zakharov et al., 2014a].

Hromadné otravy metanolem se ve světě odehrávají relativně často. Málokdy se však podaří shromáždit kvalitní klinická a laboratorní data od intoxikovaných osob, jejichž analýza by přinesla nové světlo do této problematiky. Zatím nebyly publikovány studie zaměřené na roli oxidačního stresu v mechanismech toxického poškození mozku u akutních intoxikací metanolem. Nejsou známa data o akutních biomarkerech oxidativního poškození makromolekul, jejich koncentracích a dynamice změn v průběhu otravy a v následujícím období po demisi z nemocnic. Role oxidačního stresu v mechanismech primárního poškození mozku kyselinou mravenčí a neurozánětu také není dostatečně vysvětlena. Hlubší znalosti mechanismů toxického účinku metanolu mohou poskytnout nové cesty a způsoby prevence dlouhodobých následků otrav ze strany zraku a centrálního nervového systému.

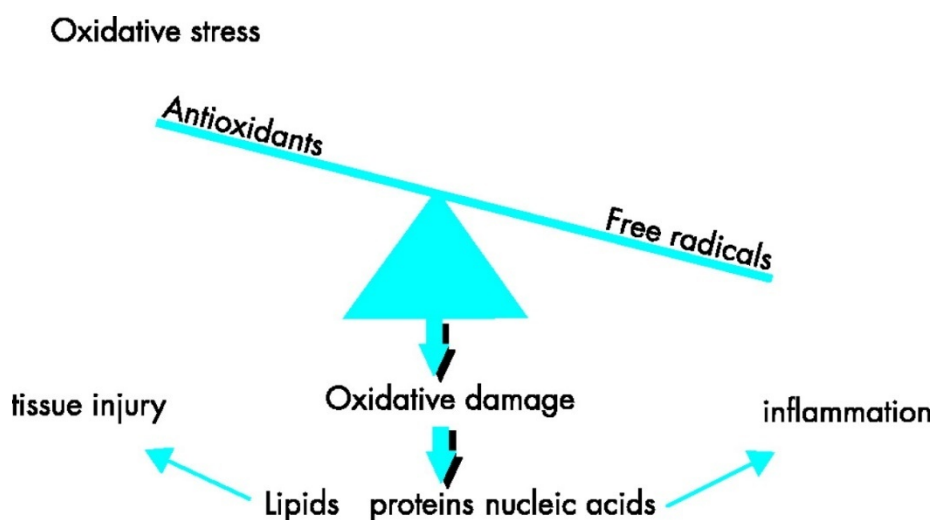
## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Oxidační stres

V lidském organismu dochází i za fyziologických podmínek ke vzniku malého množství volných kyslíkových radikálů, tzv. oxidantů [Calabrese et al., 2001]. Za normálních okolností mají buňky účinné antioxidační systémy jako glutathion apod., které volné radikály eliminují [Cutler et al., 2005]. Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi tvorbou oxidantů a schopností antioxidantů je odbourávat a detoxikovat (obrázek 1), která může vést k oxidačnímu poškození biologických makromolekul v buňce [Calabrese et al., 2006]. Oxidační stres může být vyvoláván jak exogenními, tak endogenními příčinami. Mezi exogenní příčiny patří například akutní intoxikace.

Oxidační stres je tedy důsledkem nadměrného uvolňování reaktivních kyslíkových působků, nebo „reactive oxygen species“ (ROS) [Cadet et al., 1998]. ROS jsou definovány jako molekulární entity, které jsou schopny reagovat s různými buněčnými komponentami a poškozovat je přes mechanismy oxidace makromolekul [Hayyan et al., 2016]. Jejich nadprodukce vede k narušení integrity lipidů, proteinů a nukleových kyselin v buňkách [Cadet et al., 1998]. Pro proteiny je typická zejména oxidace sulfhydrylových skupin, což může mít za následek deaktivaci kanálových proteinů a změny funkcí klíčových buněčných enzymů [Calabrese et al., 1998, 2000]. Modifikace bází nukleových kyselin může vést k alteraci genetického kódu [Hawkins et al., 2001]. Peroxidace lipidů vede k poškození buněčných membrán, produkci peroxidů a toxických reaktivních aldehydů [Dalle Donne et al., 2006].

**Obrázek 1.** Oxidační stres, schéma [Kelly FJ et al., 2003]

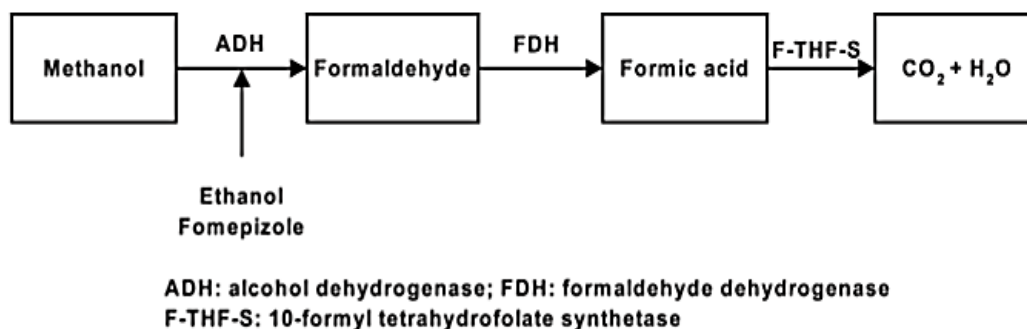


Buňka má několik účinných mechanismů, kterými se proti účinkům ROS brání. Zásadní význam v antioxidační ochraně má tripeptid glutathion (GSH), který se podílí na likvidaci volných kyslíkových radikálů, produktů lipoperoxidace, tedy na redukci ROS [Van Acker et al., 2012]. Mezi další významné enzymatické antioxidanty patří superoxiddismutáza (SOD), glutathionreduktáza, kataláza a metaloenzymy. Důležitou roli hrají i redukující molekuly, jako haptoglobin, albumin, vitaminy E a C, thioly, koenzym Q, karotenoidy a jiné. [Birben et al., 2012].

## 2.2 Mechanismus toxického účinku metanolu

Metanol je sám o sobě málo toxickou látkou, vysokou toxicitu mají však jeho metabolity [Barceloux et al., 2002]. V první fázi metabolismu je oxidován na formaldehyd. Metanol je konvertován v organismu na formaldehyd třemi možnými cestami. U člověka a primátů je přibližně 90 % metanolu oxidováno zejména v játrech cytosolickým enzymem alkoholdehydrogenázou (ADH) [Cederbaum et al., 2012]. Dalších 9 % katabolyzuje cytochrom P450 – CYP2E1, který se uplatňuje hlavně při vysokých koncentracích metanolu. Aktivita cytochromu P450 je popsána v celé řadě tkání [Caro et al., 2004]. Konečně část metanolu je metabolizována enzymem katalázou v neuronech mozku [Deng et al., 2008].

Formaldehyd se v organismu nehromadí, jelikož jeho eliminační poločas je velmi krátký, pouze 1-2 min [McMartin et al., 1979]. Rychle je enzymem aldehyddehydrogenázou (ALDH) konvertován na kyselinu mravenčí [McMartin et al., 1975]. Kyselina mravenčí se dále oxiduje na vodu a oxid uhličitý. K této reakci je nezbytný koenzym tetrahydrofolát (THF) [Tephly, 1991]. Hlodavci mají v játrech větší zásoby THF než lidé, rovněž aktivita enzymu 10-formyl-THF- dehydrogenázy je u hlodavců větší než u primátů. To je důvod, proč je metanol pro laboratorní zvířata mnohem méně toxický než pro člověka [Johlin et al., 1987]. Schematické znázornění metabolismu metanolu je na obrázku 2.

**Obrázek 2.** Metabolismus metanolu, schéma [Barceloux et al., 2002]

Kumulace kyseliny mravenčí v organismu vede k inhibici enzymu cytochrom c oxidázy v mitochondriích, který je důležitou součástí dýchacího řetězce. To má za následek sníženou produkci adenosintrifosfátu (ATP), histotoxickou hypoxii a hromadění laktátu [Barceloux et al., 2002, Seme et al., 2001]. Akumulace kyselin mravenčí a mléčné vede k rozvoji těžké metabolické acidózy s vysokým aniontovým oknem [Barceloux et al., 2002, Jacobsen et al., 1986]. Neléčená nebo pozdě léčená akutní otrava vede k multiorgánovému selhání a smrti. Za letální dávku metanolu se označuje 1 g/kg [Barceloux et al., 2002]. Odhadovaná dávka, která může nevratně poškodit zrak, se u dospělých odhaduje na 30 ml metanolu [Jacobsen et al., 1986].

K toxickému účinku kyseliny mravenčí jsou nejnáchylnější neurony bazálních ganglií mozku, gangliové buňky sítnice a axony zrakového nervu [Karayel et al., 2010]. Obrazy z magnetické resonance ukazují u intoxikovaných osob edém a nekrotické poškození bazálních ganglií, hlavně putamen, hemoragie v subkortikální bílé hmotě [Roberge et al., 1998]. Inhibice cytochrom c oxidázy způsobuje selhání Na – K ATPázy, což vede k edému neuronů mozku [Deniz et al., 2000]. Acidemie potencuje účinek kyseliny mravenčí na centrální nervový systém, jelikož usnadňuje její přechod hematoencefalickou bariérou [Blanco et al., 2006, Zakharov et al., 2014a, b].

## 2.3 Klinický obraz otravy metanolem

Příznaky intoxikace metanolem jsou limitovány na příznaky ze strany CNS, poruchy zraku různého stupně, dušnost a gastrointestinální obtíže [Barceloux et al., 2002]. Po požití metanolu nastává latentní doba trvající 12-24 hodin a více, kdy se hromadí dostatečné množství kyseliny mravenčí pro manifestaci akutní otravy. Pokud pacient zároveň konzumuje etanol, bude období latence trvat delší dobu, jelikož etylalkohol je metabolizován

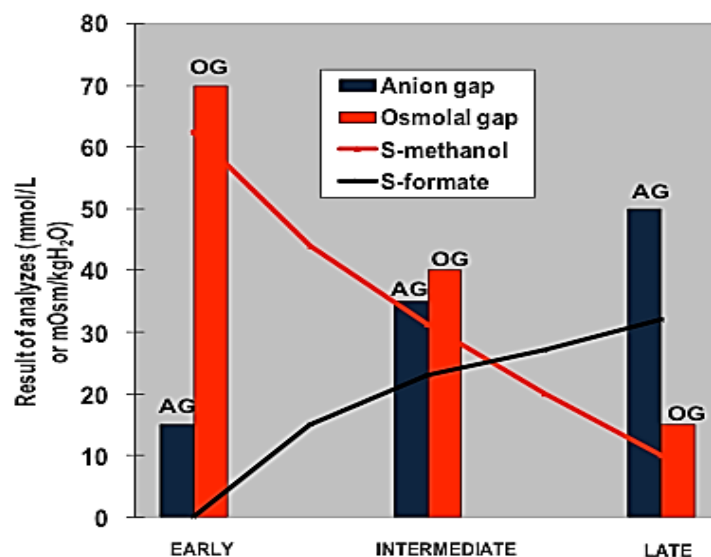


alkoholdehydrogenázou přednostně [Jacobsen et al, 1982]. Krátce po požití koncentrovaného metanolu se může objevit nauzea, zvracení, bolest břicha. Pacienti si často příliš pozdě uvědomují, že jejich stav není běžnou „kocovinou“, což má za následek pozdější hospitalizaci a zahájení léčby [Paasma et al., 2007; Zakharov et al., 2015a].

Prvními příznaky systemové toxicity bývají pocity slabosti, anorexie, bolest hlavy, nauzea, zvracení, to vše je často doprovázeno pocitem dušnosti a hyperventilací kompenzující metabolickou acidózu. Typické jsou poruchy zraku – rozmazané vidění, snížená ostrost, vidění tunelu, fotofobie a obraz "sněhové bouře" [Jacobsen et al., 1997]. Na očním pozadí bývá přítomna hyperémie a edém v oblasti nervus opticus [Desai et al., 2013; Hassanian-Moghaddam et al., 2007; Sanaei-Zadeh et al., 2012]. Neurologické symptomy, zejména sopor a kóma, jsou projevem těžké otravy s rozvojem edému mozku a patří mezi prognosticky nepříznivé klinické příznaky [Hovda et al., 2005; Paasma et al., 2009; Sanaei-Zadeh et al., 2013; Zakharov et al., 2014a,b; 2015c]. Pokud není otrávená osoba léčena v časných stádiích otravy, může se vyvinout kóma, respirační a oběhové selhání.

## 2.4 Diagnostika a terapie intoxikace metanolem

Diagnóza intoxikace metanolem je založena na anamnestickém údaji o požití alkoholického nápoje a na nálezů typických klinických a laboratorních příznaků a symptomů. Užitečný je výpočet osmolárního a aniontového okna nebo „gapu“, na základě jejichž hodnot lze odhadnout hladinu metanolu a předpovědět závažnost otravy [Olson et al., 2007; Zakharov et al., 2015a,b]. Aniontový gap (AG) je zpočátku nízký, stoupá s rozvojem acidózy a snížením koncentrace hydrogenkarbonátu [Barceloux et al., 2002, McMartin et al., 1983]. Pro potvrzení diagnózy se stanovuje sérová koncentrace metanolu, přičemž hodnota vyšší než 200 mg/L je považována za toxickou, vyšší než 400 mg/L signalizuje závažnou intoxikaci [Barceloux et al., 2002]. V pozdějších stádiích akutní otravy se již metanol z větší části metabolizuje na mravenčanu, a proto je jeho sérová hladina nízká, někdy až nedetekovatelná (obrázek 3). Diagnóza akutní otravy metanolem může být stanovitelná také měřením sérové koncentrace formátu. Dále se standardně vyšetřuje biochemie krevního séra, monitorují se krevní plyny, hladiny etanolu a laktátu [Olson et al., 2007].

**Obrázek 3.** Tři stádia akutní otravy metanolem [Hovda et al., 2004]

V léčbě pacientů intoxikovaných metanolem je zásadní co nejdříve podat antidotum inhibující ADH (etanol nebo fomepizol). Ke korekci metabolické acidózy se používá bikarbonát. Je doporučena substituce folátu buď ve formě kyseliny listové nebo folinové. Hemodialýza je indikována v případě těžké metabolické acidózy, přítomnosti zrakových poruch a neurologické symptomatologie, při hladině metylalkoholu v krvi nad 500 mg/L nebo kyseliny mravenčí v krvi nad 200 mg/L [Barceloux et al., 2002; Jacobsen D, McMartin KE, 1986].

## 2.5 Toxické poškození mozku a neuroinflamace

Všechny tkáně jsou vystavovány oxidačnímu stresu, mozek je však vůči němu mimořádně citlivý, protože spotřebovává velké množství kyslíku [Halliwell et al., 1999]. Pro normální funkci neuronů mozku je nezbytná vysoká aktivita mitochondrií [Halliwell et al., 2001]. Z tohoto důvodu jsou látky, které inhibují mitochondriální funkce a přitom snadno přestupují hematoencefalickou bariérou, vysoce neurotoxické. Patří mezi ně například kyanidy, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine a rotenon [Kramer et al., 1998]. Dalším důvodem vulnerability neuronů mozku je, že jejich buněčné membrány obsahují větší množství nenasycených mastných kyselin, které jsou mimořádně náchylné k lipoperoxidaci [Mark et al. 1997]. Metabolickými procesy vzniká v mozku peroxid vodíku, například při oxidaci dopaminu a dalších neurotransmiterů, které jsou autooxidovatelné [Halliwell et al.,

2001; Spina et al., 1989]. Mozkové tkáně jsou bohaté na železo uvolňované při jejich toxickém poškození. Ionty uvolněného železa katalyzují reakce, při kterých vzniká peroxid vodíku nebo dochází k lipoperoxidaci a autooxidaci neurotransmiterů [Gutteridge et al., 1992]. Neurony mozku mají řadu antioxidačních systémů, například SOD, GSH, ALDH2 a glutathion peroxidázu [Halliwell et al., 1999]. Je známo, že bílá i šedá hmota a mozkomíšní mok obsahují vyšší koncentrace askorbátu, který mimo jiné hraje roli inhibitoru oxidativního poškození [Rice Evans et al., 1989]. Dalšími důležitými molekulami s protektivními vlastnostmi proti oxidačnímu stresu v mozku jsou alfa tokoferol a ubiquinol, karotenoidy, flavonoidy a řada proteinů schopných vázat volné železo [Podda et al., 1996].

Stav oxidačního stresu v mozku může být vyvolán celou řadou příčin: traumatickým poraněním, akutními otravami, infekcemi, nádory, dokonce i procesy fyziologického stárnutí [Mayer et al., 2013]. Důležitým mechanismem hrajícím významnou roli v mechanismech toxického poškození mozku je neurozánět zprostředkovaný aktivací buněk glie [Morganti-Kossmann et al., 2007]. Akutní zánět je rychlou reakcí na poškození mozku a je primárně obrannou reakcí, která umožňuje tvorbu podmínek pro ohraničení a reparaci poškozené oblasti. Chronický zánět je však výsledkem přetrvávajících patologických podnětů a může vést k neurodegeneraci [Streit et al., 2004].

Akutní neurozánět je přirozenou odpovědí mozku na traumatické a netraumatické poranění, která je odstartována buňkami mikrogliie a astrocyty a vede k uvolňování prozánětlivých mediátorů – leukotrienů, cytokinů a interleukinů [Corser-Jensen et al., 2014]. Při poškození hematoencefalické bariéry je možný vstup leukocytů a periferních mediátorů zánětu do mozku. [Streit et al., 2004]. Akutní zánětlivá reakce mozkového imunitního systému mozku může být jak škodlivá, tak i protektivní, například může vést k omezení poškození dalších oblastí mozku, k obnovení homeostázy, ochraně přežívajících neuronů a podpoře obnovy a reparace v pozdějších stádiích [Ciceri et al., 2001; Duffield et al., 2003, Lagraoui et al., 2012, Stence et al., 2001]. Reaktivní astrocyty tvoří fyzickou bariéru mezi nekrotickou a zdravou mozkovou tkání, což umožňuje zotavení a prevenci dalšího poškození mozku [Farias et al., 2007; Karve et al., 2016; Sofroniew et al., 2009].

Odezva endogenního imunitního systému mozku na toxické nebo traumatické poškození je řízena komplexními interakcemi prozánětlivých, specializovaných pro-rozlišujících a protizánětlivých mediátorů [Parthasarathy et al., 2007; Zakaryan et al., 2011]. Problémem je však možný přechod akutního neurozánětu do chronického. Jsou údaje svědčící, že

neuroinflamace je klíčovým faktorem nástupu a progresu chronické degenerace a ztráty neuronů u řady neurodegenerativních onemocnění [Kempuraj et al., 2016].

## 2.6 Peroxidace lipidů buněčných membrán

Lipidy jsou biomolekuly nejméně odolné vůči oxidativnímu poškození [Dalle-Donne et al., 2006]. Obzvláště lipidy obsažené v neuronálních membránách jsou extrémně vulnerabilní, jednak proto, že je v mozku relativně slabší kapacita antioxidantních systémů, a jednak proto, že neuronální membrány mají větší obsah nenasycených mastných kyselin, které jsou náchylné k lipoperoxidaci [Dalle Donne et al., 2006]. Oxidativním poškozením lipidů buněčných membrán vznikají biologicky aktivní isoprostany a reaktivní aldehydy [Moore et al., 1998].

Reaktivní aldehydy mají řadu důležitých funkcí, například funkci buněčných posílčků, aktivují astrocyty a buňky mikroglie, iniciují produkci leukotrienů, spouští expresi řady prozánětlivých genů [Toyokuni et al., 1995; Ciceri et al., 2001]. Reaktivní aldehydy mohou vznikat z eikosanoidů neenzymatickou cestou za podmínek oxidačního stresu [Kunz et al., 2007]. Enzymatickou cestou z eikosanoidů vznikají prostaglandiny a leukotrieny [Kunz et al., 2002]. Tedy mají obě skupiny látek stejné prekurzory, což může vysvětlovat jejich vzájemnou provázanost v mechanismech toxického poškození mozku [Riahi et al., 2010].

## 2.7 Oxidativní poškození nukleových kyselin a proteinů

Oxidativní poškození nukleových kyselin je jedním ze známých mechanismů vzniku mutací [Evans et al., 2004]. Působení oxidačního stresu vede k hydroxylaci a hydrolytické deaminaci nukleových bází. NK mohou být dále přímo poškozeny při reakcích s toxickými aldehydy vzniklými při lipoperoxidaci [Parthasarathy et al., 2007]. Nejvíce prozkoumané oxidační produkty nukleových kyselin jsou 8-hydroxyguanin (8-OHG) a jeho deoxynukleosidový ekvivalent 8-OHdG, které jsou nejčastěji používány jako markery oxidativního poškození nukleových kyselin [Aruoma et al., 2005]. V molekulách RNA je pravděpodobnost oxidativního poškození ještě větší, jelikož RNA nemá ochranné histony [Nunomura et al., 2000].

Pro oxidaci molekul proteinů je typický “střih” polypeptidových řetězců, různé modifikace aminokyselinových řetězců a ve finále konverze proteinů na deriváty, které jsou vysoce citlivé na proteolytickou degradaci [Stadtman et al., 2006]. Oxidativně modifikované

proteiny nejsou opravovatelné a musí být odstraněny. Snížená účinnost mechanismů proteolýzy vede ke zvýšení buněčného obsahu oxidativně modifikovaných proteinů. Oxidované proteiny ztrácejí svou biochemickou funkci, což má za následek negativní vliv na klíčové buněčné procesy [Stadtman et al., 2006].

## **2.8 Preventivní faktory v mechanismech toxického poškození centrálního nervového systému**

Častým nálezem na magnetické rezonanci mozku u osob, které přežily otravy metanolem, jsou bilaterální nekrózy putamen. Podle studií Zakharova et al. a Vaněčkové et al., byly přítomny u 32 % otrávených osob, které byly sledovány po hromadné intoxikaci v ČR. Další nekrotická ložiska byla nalezena v globus pallidus, mozkovém kmeni, subkortikální bílé hmotě, nucleus caudatus, mozečku a optickém nervu. Mozkové krvácení bylo přítomno u 33 % přeživších a nejčastěji bylo lokalizováno v putamen a globus pallidus [Vaneckova et al., 2014, 2015, Zakharov et al., 2016a].

V literatuře je krvácení do mozkových struktur popisováno jako vzácná komplikace, která má navíc příčinu v současné antikoagulaci během hemodialýzy [Hernandez et al., 2004, Giudicissi Filho et al., 1995]. Tato hypotéza nebyla potvrzena ve studii Zakharova et al. z roku 2016a. Podle této studie se krvácení objevilo u osob přeživších otravu léčených i bez systémové antikoagulace. Mozkové krvácení je prokazatelně častější u těžších otrav. Bylo zaznamenáno u osob s vyšší sérovou glukózou a laktátem, což může být způsobeno delší a těžší hypoxií mozku. Ale také u osob, které měly i další příznaky těžké otravy a komplikace – delirium, akutní pankreatitidu, infarkt myokardu atd. [Zakharov et al., 2016a,b].

Další ze studií Zakharova et al. poskytla údaje o sérových koncentracích formátu a jim odpovídajících klinických nálezech. Pacienti s následky CNS měli průměrnou koncentraci mravenčanu v séru 15,9 mmol / l (IQR 14,2–19,5 mmol / l). Pacienti s následky zraťovými i CNS měli střední koncentraci mravenčanu v séru 19,1 mmol / l (IQR 14,3–20,6 mmol / l). Konečně, ti, kteří zemřeli, měli střední koncentraci mravenčanu v séru 15,2 mmol / l (IQR 13,8–15,9 mmol / l) [Zakharov et al., 2014a,b].

Pokud chceme redukovat negativní účinek kyseliny mravenčí na mozek, musíme urychlit její eliminaci. Z dialyzačních metod je nejvýhodnější intermitentní dialýza (IHD) [Zakharov et al., 2014c]. Průměrný eliminační poločas metanolu je u IHD 3,7 hodiny, pro format je to 1,6 hodiny. U kontinuálních metod je to 8,1 a 3,6 hodiny [Zakharov et al., 2014c]. IHD

v kombinaci s podáváním bikarbonátu je rovněž nejefektivnější metoda k terapii metabolické acidózy [Zakharov et al., 2014c, 2017a,b].

Vzhledem k omezeným zásobám tetrahydrofolátu v játrech člověka je možná jeho substituce. Význam doplnění folátů na snížení výskytu následků otravy se však zatím nepodařilo prokázat [Zakharov et al., 2014b].

Při hromadné otravě metanolem v České republice v roce 2012 byla pacientům podávána obě dostupná antidota – etylalkohol i fomepizol [Zakharov et al., 2015c]. Fomepizol byl některými autory považován za účinnější, avšak mnohem dražší antidotum, které nemá tlumivé účinky na CNS a je vhodné i pro děti a gravidní ženy [Olson et al., 2007]. Studie Zakharova et al. z roku 2015 však neprokázala rozdíly v klinické účinnosti obou antidot [Zakharov et al., 2015c].

Nejdůležitějším preventivním opatřením je jednoznačně přednemocniční podání antidota – alkoholu. Pozitivní sérová koncentrace alkoholu u otrávených osob při přijetí do nemocnice byla spojena s lepší prognózou. U otrávených osob, kteří nejsou v bezvědomí, by tedy alkohol měl být podán laiky i zdravotníky ještě před hospitalizací [Zakharov et al., 2017a].

### 3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo zjistit roli oxidačního stresu v mechanismech toxického poškození CNS u akutních otrav metanolem. Na základě prospektivního sledování zdravotního stavu souboru pacientů, kteří přežili akutní otravu metanolem, se předpokládá, že bude možné odpovědět na následující otázky:

- 1) Jaká je role oxidačního stresu v patogenezi akutního neuronálního poškození CNS a rozvoji dlouhodobých následků otravy?
- 2) Jaká je role mechanismů oxidačního stresu v rozvoji chronických neurodegenerativních procesů v letech následujících po akutní expozici metanolu?

Za tímto účelem plánujeme stanovit schopnost určitých biomarkerů oxidativního poškození a zánětu předpovědět charakter dlouhodobých následků expozice metanolu a dynamiku pozdních neurodegenerativních změn. Získané informace mohou sloužit v prevenci dlouhodobých následků intoxikací metanolem ze strany CNS a zraku, jakož i ke zvyšování znalostí o roli environmentálních expozic toxickým látkám v rozvoji neurodegenerativních procesů.

#### 4. SOUBOR PACIENTŮ A METODIKA

V září až prosinci roku 2012 a v dalších letech bylo v České republice přijato do 30 nemocnic v 11 regionech celkem 108 pacientů s potvrzenou akutní otravou metanolem. Z těchto osob intoxikaci nepřežilo 24 lidí. Ošetřující lékaři zprostředkovávali sběr dat, zaznamenávali okolnosti intoxikace, symptomy a jejich dynamiku. Informace byly získávány prostřednictvím dotazníků. Buď přímo od postižených osob nebo od příbuzných obětí. Toxikologické informační středisko na Klinice pracovního lékařství Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy zpracovávalo a analyzovalo výsledky laboratorních toxikologických a biochemických vyšetření, neurologických a oftalmologických vyšetření, zobrazovací vyšetření – MR/CT a všechny propouštěcí zprávy.

Při příjmu do zdravotnického zařízení byly odebrány vzorky na laboratorní stanovení koncentrace metanolu, etanolu, kyseliny mravenčí, laktátu, glukózy, albuminu v krevním séru, jaterní a renální testy, byla analyzována acidobazická rovnováha, koagulační vyšetření (INR, APTT, trombocyty, fibrinogen), krevní obraz.

Pro potvrzení akutní otravy metanolem byla stanovena následující kritéria:

Koncentrace metanolu v séru nad 200 mg/L (6,2 mmol/L) a potvrzená informace o požití vysoce koncentrovaných alkoholických nápojů. Nebo byla diagnóza intoxikace stanovena na základě symptomů, anamnézy, přítomnosti metanolu v séru a splnění nejméně dvou z následujících kritérií: pH arteriální krve menší než 7,3, koncentrace bikarbonátu pod 20 mmol/L, aniontový gap nad 20 mmol/L.

Léčba intoxikovaných probíhala na základě doporučení Americké akademie pro klinickou toxikologii (AACT) a Evropské asociace klinických toxikologů (EAPCCT). Pokud byla koncentrace metanolu v séru vyšší než 500 mg/L (15,6 mmol/L), byla přítomna metabolická acidóza (pH arteriální krve <7,30) nebo porucha zraku při příjmu do zdravotnického zařízení, byla použita hemodialýza. Pro výběr mezi intermitentní nebo kontinuální hemodialýzou byly rozhodující následující faktory: oběhová stabilita pacienta, závažnost intoxikace, dostupnost dialyzačních přístrojů etc. Těžce acidotickým pacientům (pH arteriální krve <7,20) byl aplikován 8,4% nebo 4,2% roztok bikarbonátu. Antidotem podávaným pro blokádu alkoholdehydrogenázy byl etanol nebo fomepizol (4-methylpyrazol). K doplnění vnitřních zásob folátu byla pacientům podávána kyselina folinová nebo kyselina listová.



Všem přeživším obětem otravy metanolem byla nabídnuta účast na prospektivní kohortové studii zabývající se rolí oxidačního stresu u akutních otrav metanolem. Akutní otravu metanolem přežilo 84 lidí. Studie se zúčastnilo 55 pacientů (65 %), jejich průměrný věk byl  $46,7 \pm 3,6$  let (46 mužů a 9 žen). Jejich vyšetřování probíhalo mezi roky 2013 a 2018. Studie byla schválena Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Z celkového počtu 55 osob ve studii zahynulo 8 osob před třetí sérií sběru dat. Dalších 5 osob se do studie zapojilo až později, proto absolvovali pouze jedno až dvě kola studie. Všechna tři kola klinického vyšetřování během čtyř let proběhla tedy celkově u 42 osob, 34 mužů a 8 žen. Kontrolní skupina byla složena ze 41 osob ve věku  $44,0 \pm 4,2$  let. Co se týče osob s chronickým ethylismem, bylo jejich zastoupení stejné v obou skupinách – 23 osob ve sledovaném souboru a 24 v souboru kontrol. U 28 osob se podařilo během hospitalizace odebrat více než tři krevní vzorky pro měření akutních markerů oxidačního stresu a neuroinflammace a tyto osoby tak vytvořily „Akutní“ skupinu s otravou metanolem, skupinu I, N=28. Follow-up skupina (skupina II) byla tvořena 36 osobami přeživšími otravu, u kterých byly změřeny následné koncentrace uvedených markerů – tuto skupinu tvořilo 12 osob ze skupiny I a 24 osob bez akutních odběrů vzorků sledovaných v rámci prospektivní studie (tabulka 1).

**Tabulka 1.** Vstupní laboratorní data při hospitalizaci u pacientů s akutní intoxikací metanolem (Group I) a u pacientů ve „follow-up“ skupině (Group II)

Groups	MetOH, mg/L	EtOH, mg/L	Formic acid, mg/L	pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	Lactate, (mM)	BE, (mM)	Glucose, (mM)	Creatinine, (μM)	AG (mM)	Time, hours
<b>Group I</b> (n=28)	1220±420	160±130	590±140	7,06±0,10	9,1±2,7	5,4±2,0	-18,2±5,6	9,7±2,0	95,0±17,0	29,7±4,0	38,4±8,3
<b>Group II</b> (n=36)	1340±440	490±340	500±180	7,19±0,27	12,4±2,6	3,6±1,6	-15,2±3,9	7,6±1,2	93,0±13,0	27,1±3,9	33,5±8,0
<i>PI/Control</i>	<i>0,706</i>	<i>0,078</i>	<i>0,419</i>	<i>0,392</i>	<i>0,088</i>	<i>0,184</i>	<i>0,355</i>	<i>0,079</i>	<i>0,837</i>	<i>0,355</i>	<i>0,408</i>

Poznámky: MetOH – koncentrace sérového metanolu při přijetí; EtOH – koncentrace sérového etanolu při přijetí; Formic acid – sérová koncentrace kyseliny mravenčí při přijetí; BE – base excess; AG – anion gap; pH – pH arteriální krve; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - koncentrace bicarbonatu; Lactate – sérová koncentrace laktátu při přijetí; Glucose – glykemie při přijetí; Creatinine – koncentrace sérového kreatininu při přijetí; Time – čas od požití metanolu po přijetí to nemocnice;  $p < 0,05$  bylo považováno za signifikantní

## 4.1 Protokol klinického vyšetření

Vyšetřování přeživších pacientů proběhlo třikrát za čtyři roky sledování –  $4,9 \pm 0,6$  měsíců,  $25,0 \pm 0,6$  měsíců, a  $49,9 \pm 0,5$  měsíců po dimisi ze zdravotnického zařízení. Vyšetřovací proces probíhal ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze, dle stejného protokolu byly vyšetřeny osoby po otravě i kontrolní osoby.

Vyšetřovací protokol zahrnoval vyšetření mozku magnetickou resonancí (MRI) nebo výpočetní tomografií (CT) při kontraindikacích k MRI. Všichni pacienti podstoupili neurologické vyšetření reflexů, motorických, senzorických a hlavových nervů, mozečkových funkcí. Vyšetřovací protokol obsahoval posouzení zrakových funkcí, včetně kompletního očního vyšetření, běžných oftalmologických testů, zrakových evokovaných potenciálů a optické koherenční tomografie (OCT) sítnicových nervových vláken (RNFL). Při biochemickém vyšetření byla v krevním séru stanovována koncentrace glukózy, glykovaného hemoglobinu, albuminu, prealbuminu, TSH, lipidů, vitaminů B<sub>1</sub> a B<sub>12</sub> a byly posuzovány jaterní a renální funkce. Dále byl proveden screening na přítomnost etylglukuronidu v moči a carbohydrát deficientního tranferinu.

## 4.2 Laboratorní vyšetření

Bylo nutné vyvinout vysoce selektivní a přesnou analytickou metodu na bázi kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií pro markery oxidativního stresu – 8-iso Prostaglandin F<sub>2a</sub> (8-iso PG F<sub>2a</sub>), n-alifatické aldehydy (C<sub>6</sub>-C<sub>13</sub>), 4-hydroxynonenal (= 4-HNE), 4-hydroxyhexenal (4-HHE), malondialdehyd (MDA), otyrosin (o-Tyr), 3-nitrotyrosin (NO-Tyr), 3-chlortyrosin (Cl-Tyr), 8-hydroxyguanosin (8-OHG) a 8-hydroxy2'-deoxyguanosin (8-OHdG) v krevním séru. Vyvinutou metodu bylo nutné validovat a ověřit její funkčnost při monitorování klinických vzorků u osob s různými formami oxidativního stresu (a kontrolní skupiny). Byl připraven panel biomarkerů oxidačního stresu a byla vyvinuta zcela originální metodika pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Vyvinutá metodika byla validována a následně použita pro analýzu první skupiny klinických vzorků. NMR metabolomika: byly studovány vzorky séra od 31 pacientů s akutní otravou. Všechny NMR experimenty byly změřeny na 600 MHz NMR spektrometru Bruker Avance III. Spektra byla zpracována pomocí software AMIX (binning), statistická analýza byla provedena v programech MetaboAnalyst a Matlab. Metabolity byly identifikovány srovnáním spekter s databázemi Chenomx a BBIREFCODE nebo s dříve publikovanými daty. Analýza vzorků

séra: vzorky pro NMR analýzu byly připraveny smícháním 100  $\mu$ l séra se 100  $\mu$ l fosfátového pufru (v D<sub>2</sub>O, pH 7.4) a převedením do 3 mm NMR kyvet. Metabolická data byla založena na analýze protonových spekter naměřených při teplotě 310 K pulsní sekvencí CPMG s presaturací. Spektra, referencovaná na signál anomerního protonu glukosy, byla v rozsahu 0.2-10.0 ppm rozdělena na biny o šířce 0.01 ppm, oblast signálu vody (4.33-4.84 ppm) byla z analýzy vyloučena. Intenzity jednotlivých binů byly normalizovány na celkovou plochu spektra. Identifikace a kvantifikace metabolitů: Pomocí databází a publikovaných přiřazení bylo ve vzorcích séra jednoznačně identifikováno 22 metabolitů. Normalizované intenzity jednotlivých signálů byly vypočteny jako součet normalizovaných intenzit vhodného počtu sousedících binů se šířkou 0.01 ppm. Aby byla určena statistická významnost detekovaných metabolických změn, byla všechna binovaná spektra analyzována Studentovým t-testem. V séru na konci byl pozorován signifikantní (s p-hodnotou t testu < 0.05) manitol, 3-hydroxybutyrát, aceton, glukóza, fenylacetylglucin a laktát a zároveň signifikantní pokles tyrosinu a neidentifikovaných širokých rezonancí v alifatické oblasti. MS metabolomika: existující panel cca 40 významných biomarkerů oxidačního stresu byl optimalizován a rozšířen následujícím způsobem. Derivatizace látek s amino skupinou: biomarkery oxidačního stresu obsahující ve své struktuře amino skupinu (o-Tyr, NO-Tyr, Cl-Tyr, 8-OHG, 8-OHdG) byly derivatizovány dle následujícího postupu: k 500  $\mu$ l roztoku obsahující vnitřní standardy (8-hydroxy-2'-deoxyguanosin-15N5 a tyr-d4) bylo přidáno 350  $\mu$ l borátového pufru (pH směsi 8,5 – 9) a 50  $\mu$ l roztoku derivatizačního činidla 3-aminopyridyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamátu (APDS). Roztok APDS v acetonitrilu o koncentraci 1mg/1ml, APDS činidlo bylo připraveno reakcí N,N'-dihydroxysukcinimidyl karbonátu (1,28 g, 5 mmol) s 3 aminopyridinem (470 mg, 5 mmol) v acetonitrilu (25 ml) při laboratorní teplotě, doba reakce 8 hodin. Derivatizovaný vzorek byl míchán 10 minut při laboratorní teplotě a následně 10 minut při teplotě 55 °C (rozložení nezreagovaného APDS činidla). Následně byl vzorek analyzován LC-ESI-MS metodou. Derivatizace aldehydů a karboxylových kyselin: derivatizace aldehydů (alifatické aldehydy – (C6-C13), MDA, 4-HNE a 4-HHE) a karboxylových kyselin (8-iso PGF2) byly derivatizovány s využitím Girardova činidla T (GirT) v kyselém prostředí (1% kyseliny octové) a v přítomnosti EDC činidla (derivatizace karboxylových kyselin). Derivatizační reakce probíhala při teplotě 60 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí reakční doby byla provedena LC-ESI-MS analýza. LC-ESI-MS analýza. Analýza látek byla realizována na LC-MS systému skládajícího se z degaséru, kvartérní pumpy a autosampleru Accela (Thermo Fisher Scientific, USA) a hmotnostního spektrometru s analyzátozem typu trojitý kvadrupol - TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific,

USA) s elektropřejovou ionizací (HESI). K chromatografické separaci látek derivatizovaným APDS činidlem bylo použito mobilní fáze o isokratickém složení acetonitril: voda (70:30 v/v) s pH upraveným na hodnotu 5,4 (octanem amonným) se stacionární fází tvořenou porézním grafitovým uhlíkem Hypercarb (Hypercarb Thermo, rozměry kolony - 2,1 x 100 mm, zrnitost stacionární fáze - 5  $\mu\text{m}$ , Thermo Electron Corporation, USA). Průtok mobilní fáze činil 150  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Chromatografická kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Na kolonu byl nastříkovan objem vzorku - 10  $\mu\text{l}$ . Při chromatografické separaci látek derivatizovaných GirT bylo použito isokratické eluce se složením mobilních fází metanol: voda s pH upraveným na hodnotou 9 (roztokem hydroxidu amonného) (40:60 – v/v) a identické kolony Hypercarb. Při hmotnostně-spektrometrické analýze bylo použito pozitivní elektrosprejové ionizace (ESI+) pro látky derivatizované GirT a negativní elektrosprejové ionizace (ESI-) pro látky derivatizované APDS činidlem. Scanování látek (v obou případech) probíhalo v módu neutrální ztráty (NL) s kolizně indukovanou disociací (CID). Pro derivatizační činidlo APDS bylo použito rozsahu hmot 303475 Da (Q1) a 181-353 Da (Q3) a pro derivatizační činidlo GirT bylo použito intervalů 150 - 350 Da (Q1) a 91-291 Da (Q3). Parametry hmotnostního spektrometru byly optimalizovány na následující hodnoty: napětí na kapiláře 3000 V (ESI+)/-2500V (ESI-), teplota na vstupní kapiláře 300 °C, teplota HESI výparníku 300°C, sheat gas (dusík) tlak 45 psi, pomocný plyn (dusík) 10 ArbU.

### 4.3 Analýza dat

Pro všechny proměnné byly vypočítány základní deskriptivní statistické parametry [průměr, intervaly spolehlivosti, směrodatné odchylky, skewness a kurtosis (šikmost a špičastost)] a byly testovány na normalitu rozdělení pomocí testu Kolmogorova – Smirnova testu. Chí kvadrát test byl použit ke srovnání frekvencí kategorických demografických a klinických proměnných mezi skupinami pacientů hospitalizovaných v nemocnici pro akutní intoxikací methanolu a follow up (následnými). Pro srovnání koncentrací markerů oxidativního poškození lipidů, nukleových kyselin a proteinů v séru periferní krve byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s testem nejméně významných rozdílů. Bivariační vztahy byly hodnoceny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Statistická významnost byla označena jako  $p < 0,05$ . Statistické analýzy byly provedeny v Excelu (Microsoft, Redmond, WA) a IBM SPSS verze 20.0 (Chicago, IL) a formální výpočty byly vytvořeny v softwaru QC Expert 3.1 (Trilobyte, Pardubice, Česká republika).

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Neuroinflamace a lipoperoxidace

#### 5.1.1 Leukotrieny (*Publikace I*)

Typickým nálezem na magnetické rezonanci u osob intoxikovaných metanolem je bilaterální nekróza basálních ganglií a nekrotické léze v subkortikální bílé hmotě [Vaneckova M., 2014]. Mozek reaguje na traumatické i netraumatické léze neurozánětem, což je jeden z neuroprotektivních mechanismů [Lagraoui et al., 2012]. Hlavními mediátory těchto zánětlivých dějů jsou leukotrieny [Ciceri et al., 2001]. Při mozkových lézích dochází k aktivaci neuroglií a astrocytů, které produkují leukotrieny, cytokiny a chemokiny [Blood et al., 2015].

Ve studii jsme zkoumali akutní koncentrace a dynamiku změn koncentrace leukotrienu LTB<sub>4</sub> a cysteinyl leukotrienů (cys-LTs): LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> v séru periferní krve u pacientů s potvrzenou otravou methanolem během hospitalizace a testovali schopnost těchto markerů odhadnout příznivou *versus* nepříznivou prognózu otravy. Dále jsme měřili koncentrace leukotrienů u přeživších pacientů dva roky po propuštění z nemocnice, abychom otestovali jejich souvislost s dlouhodobými zdravotními následky otravy metanolem.

##### 5.1.1.1 Akutní sérová koncentrace leukotrienů během hospitalizace a prognóza intoxikace

Maximální a průměrné sérové koncentrace cys-LTs a LTB<sub>4</sub> měřené během hospitalizace byly signifikantně vyšší než follow up koncentrace leukotrienů měřené dva roky po propuštění (obrázek 4). Ve skupině pacientů s akutně měřenými koncentracemi leukotrienů během hospitalizace byly maximální a průměrné koncentrace LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> a maximální koncentrace LTE<sub>4</sub> signifikantně vyšší u pacientů přeživších otravu než u zemřelých (tabulka 2). Po eliminaci „outliera“, který zemřel na jaterní alkoholickou cirhózu dva měsíce po přijetí do nemocnice, byly maximální a průměrné koncentrace všech měřených leukotrienů u pacientů, kteří zemřeli, signifikantně nižší než u přeživších. Čas sledování u přeživších a zemřelých se nelišil ( $86 \pm 21$  versus  $98 \pm 73$  hodin,  $p=0,639$ ). Akutní maximální a průměrné sérové koncentrace LTB<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub> byly signifikantně vyšší u přeživších bez následků otravy než u těch, kteří intoxikaci přežili s dlouhodobým postižením zraku a CNS (tabulka 2).

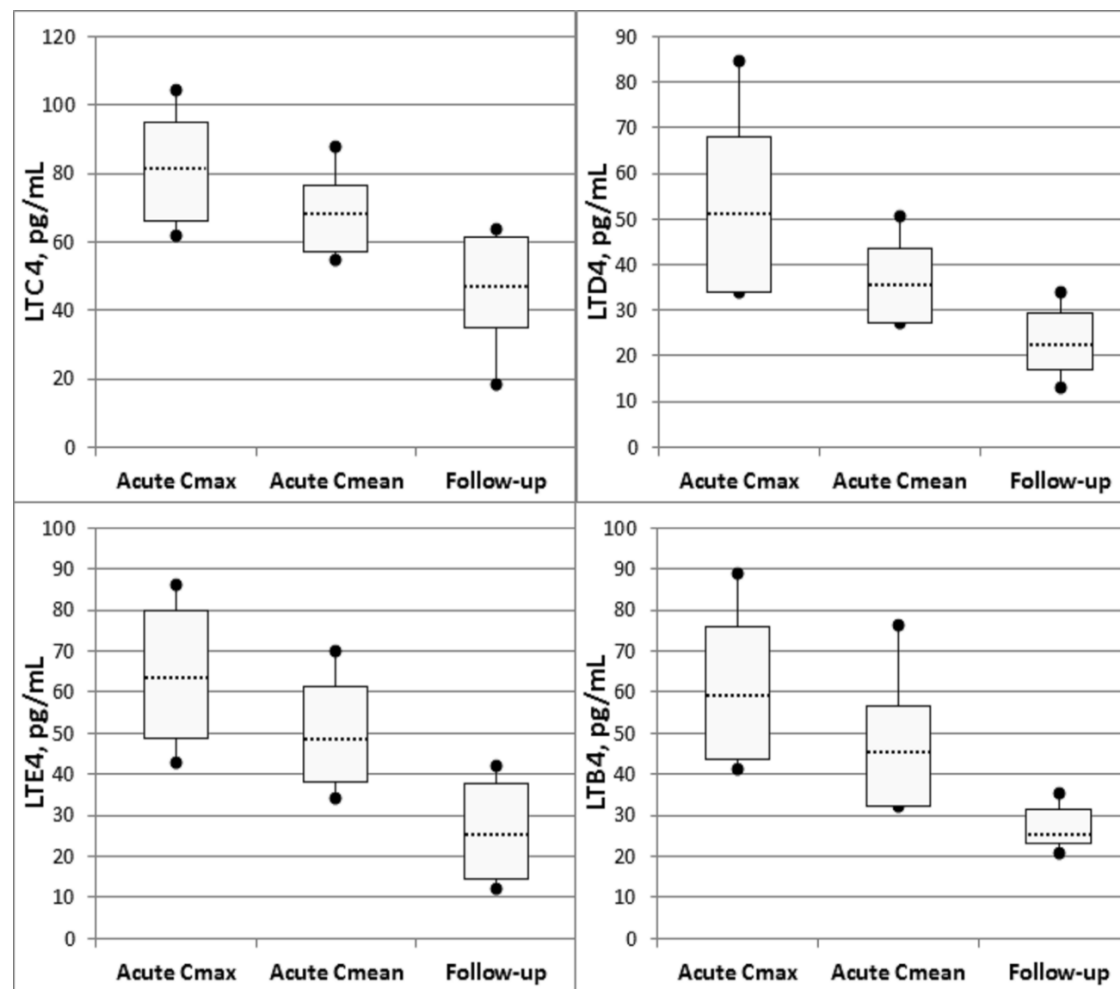
Dynamika akutních sérových koncentrací leukotrienů je na obrázku 5. Koncentrace všech měřených leukotrienů stoupala během prvních 4–5 dnů hospitalizace a dosahovala vrcholu přibližně za 100–120 hodin po přijetí do nemocnice. Poté postupně klesala během dalších dnů hospitalizace. Přibližná rychlost vzestupu u akutních sérových koncentrací byla 0,4–0,5 pg/mL/hod pro všechny měřené leukotrieny.

Akutně měřené koncentrace leukotrienů korelovaly se závažností metabolické acidózy vyjádřenou hodnotami „base excess“ a „anion gap“. Pacienti s těžší acidózou, více otrávení, měli signifikantně nižší akutní sérové koncentrace leukotrienů v porovnání s pacienty s mírnou metabolickou acidózou.

V rámci studie nebyla nalezena asociace mezi sérovými koncentracemi leukotrienů a věkem, pohlavím, dobou hospitalizace, Glasgow coma scale, sérovým metanolem, kyselinou mravenčí, a typem podaného antidota. Pacienti, kterým byl již přednemocničně podán etanol, měli vyšší hladiny LTC<sub>4</sub> než ti, kteří antidotum před hospitalizací nedostali ( $r = 0,509$ ,  $p < 0,01$ ). Pacienti, kteří při příjmu do nemocnice měli pozitivní etanol v séru, měli rovněž vyšší koncentrace leukotrienu LTC<sub>4</sub> ( $r=0,509$ ,  $p < 0,05$ ). U pacientů léčených intermitentní hemodialýzou byla naměřena vyšší koncentrace cys-LT než u pacientů léčených kontinuální dialýzou ( $r=0,516$ ,  $0,492$ , obě  $p < 0,01$ , pro LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, a  $r = 0,418$ ,  $p < 0,05$  pro LTD<sub>4</sub>).

Z 28 pacientů, u kterých jsme měřili akutní koncentrace leukotrienů, 11 pacientů přežilo otravu bez následků, 2 pacienti přežili otravu se zrakovými následky, další dva s následky CNS, konečně 7 pacientů s CNS i zrakovými následky a 6 pacientů zemřelo v nemocnici. Pacienti s lepší prognózou měli vyšší akutní sérové koncentrace leukotrienů během hospitalizace než ti s prognózou špatnou.

**Obrázek 4** Krabicové grafy sérových koncentrací leukotrienů měřených za hospitalizace (Acute) a u přeživších dva roky po propuštění z nemocnice (Follow up).



Poznámky: Acute Cmax – maximální sérové koncentrace měřené během hospitalizace; Acute Cmean – průměrné sérové koncentrace během hospitalizace s akutní otravou metanolem. Průměr – tečkovaná linka, standartní chyba průměru (SEM, box), 95% CI od průměru jsou prezentovány  $p < 0,001$ .



**Tabulka 2** Sérové koncentrace leukotrienů měřené během hospitalizace (skupina I) a u „follow-up“ skupiny přeživších (skupina II) dva roky po propuštění (means  $\pm$  CI 95%)\*\*

Pacienti	LTC <sub>4</sub> , C <sub>max</sub> , [pg/mL]	LTC <sub>4</sub> , C <sub>mean</sub> , [pg/mL]	LTD <sub>4</sub> , C <sub>max</sub> , [pg/mL]	LTD <sub>4</sub> , C <sub>mean</sub> , [pg/mL]	LTE <sub>4</sub> , C <sub>max</sub> , [pg/mL]	LTE <sub>4</sub> , C <sub>mean</sub> , [pg/mL]	LTB <sub>4</sub> , C <sub>max</sub> , [pg/mL]	LTB <sub>4</sub> , C <sub>mean</sub> , [pg/mL]
<b>Skupina I (n=28)</b>	80,7 $\pm$ 5,6	67,0 $\pm$ 3,8	51,0 $\pm$ 6,6	35,4 $\pm$ 3,2	64,2 $\pm$ 6,0	49,8 $\pm$ 4,5	59,8 $\pm$ 6,2	44,4 $\pm$ 4,7
<b>Skupina II (n=36)</b>	47,9 $\pm$ 4,5	47,9 $\pm$ 4,5	23,1 $\pm$ 2,1	23,1 $\pm$ 2,1	26,2 $\pm$ 3,9	26,2 $\pm$ 3,9	27,2 $\pm$ 1,4	27,2 $\pm$ 1,4
<b><i>P<sub>I/Control</sub></i></b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Přeživší (n=22)</b>	83,9 $\pm$ 6,2	69,3 $\pm$ 4,0	54,2 $\pm$ 8,0	36,9 $\pm$ 3,8	66,8 $\pm$ 6,7	51,6 $\pm$ 4,6	61,0 $\pm$ 6,9	45,0 $\pm$ 5,2
<b>Zemřelí (n=6)</b>	68,8 $\pm$ 8,6	58,6 $\pm$ 7,6	39,5 $\pm$ 2,9	29,9 $\pm$ 2,3	55,0 $\pm$ 15,0	43,0 $\pm$ 16,0	55,0 $\pm$ 19,0	42,0 $\pm$ 15,0
<b>Zemřelí* (n=5)</b>	66,0 $\pm$ 6,1	55,8 $\pm$ 2,6	39,6 $\pm$ 3,9	29,7 $\pm$ 3,0	49,2 $\pm$ 7,5	37,4 $\pm$ 6,1	47,8 $\pm$ 2,2	36,5 $\pm$ 3,3
<b><i>P<sub>survived/died</sub></i></b>	<b>0,023</b>	<b>0,017</b>	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	<b>0,004</b>	<b>0,0140</b>	<b>0,455</b>	<b>0,646</b>
<b><i>P*<sub>survived/died</sub></i></b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>0,001</b>	<b>0,007</b>
<b>No sequelae (n=11)</b>	88,2 $\pm$ 9,2	71,4 $\pm$ 5,7	61,0 $\pm$ 14,0	39,8 $\pm$ 6,5	73,5 $\pm$ 9,8	56,5 $\pm$ 7,0	69,0 $\pm$ 11,0	51,0 $\pm$ 9,3
<b>Sequelae (n=11)</b>	79,6 $\pm$ 9,3	67,2 $\pm$ 6,4	47,7 $\pm$ 7,9	34,0 $\pm$ 4,3	60,2 $\pm$ 8,7	46,6 $\pm$ 5,3	52,6 $\pm$ 6,4	39,0 $\pm$ 3,0
<b><i>P<sub>no sequelae/sequelae</sub></i></b>	<b>0,178</b>	<b>0,315</b>	<b>0,114</b>	<b>0,126</b>	<b>0,044</b>	<b>0,027</b>	<b>0,011</b>	<b>0,022</b>

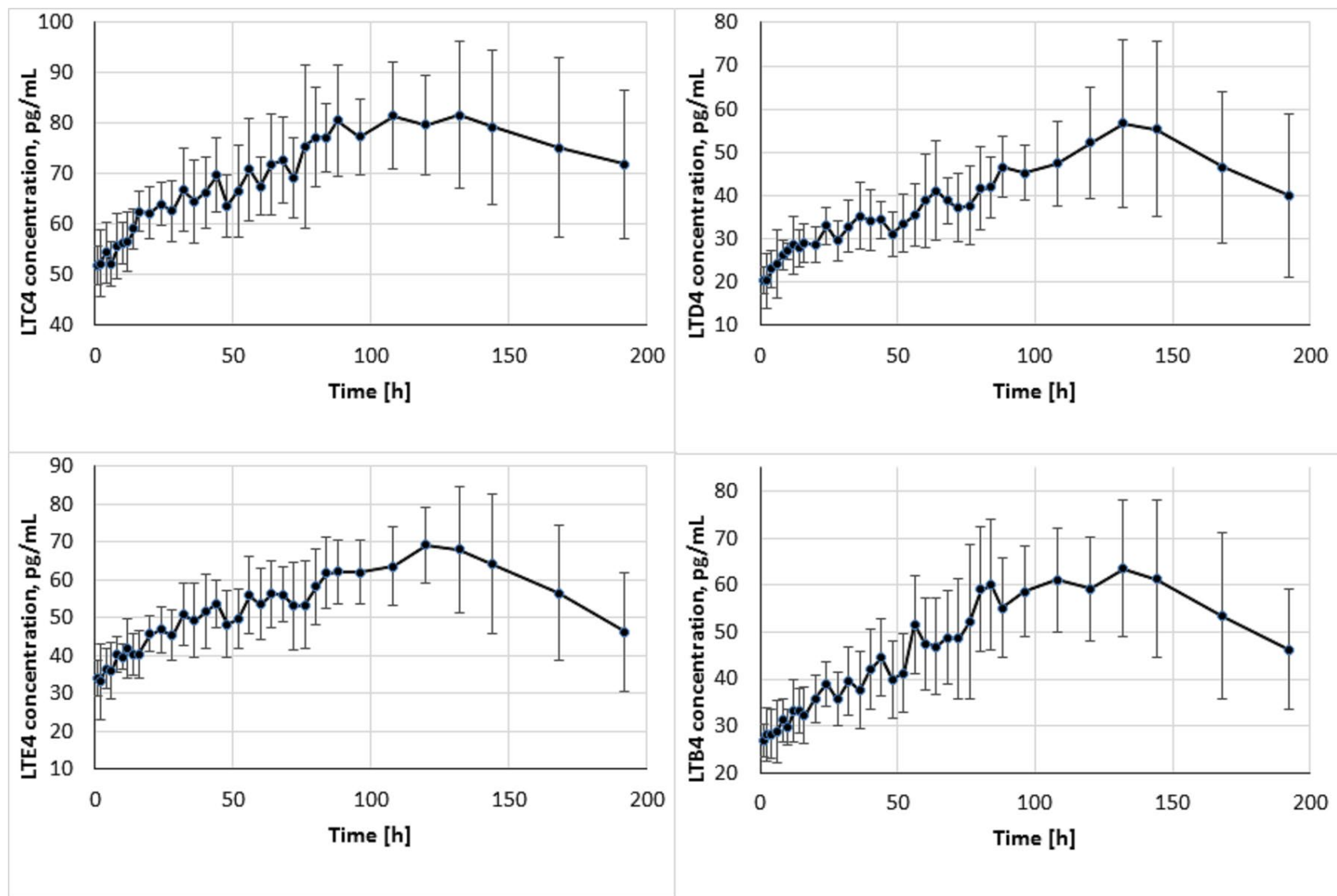
Poznámky: LT – leukotrieny; C<sub>max</sub> – maximální sérové LT koncentrace měřené během hospitalizace; C<sub>mean</sub> – průměrné sérové LT koncentrace během hospitalizace s akutní metanolovou otravou.

Bez následků – pacienti ve skupině I, kteří přežili akutní metanolovou otravu bez zdravotních následků; Následky – pacienti ve skupině I, kteří přežili akutní metanolovou otravu s dlouhodobými zraťovými a/nebo CNS následky; p < 0,05 bylo považováno za signifikantní.

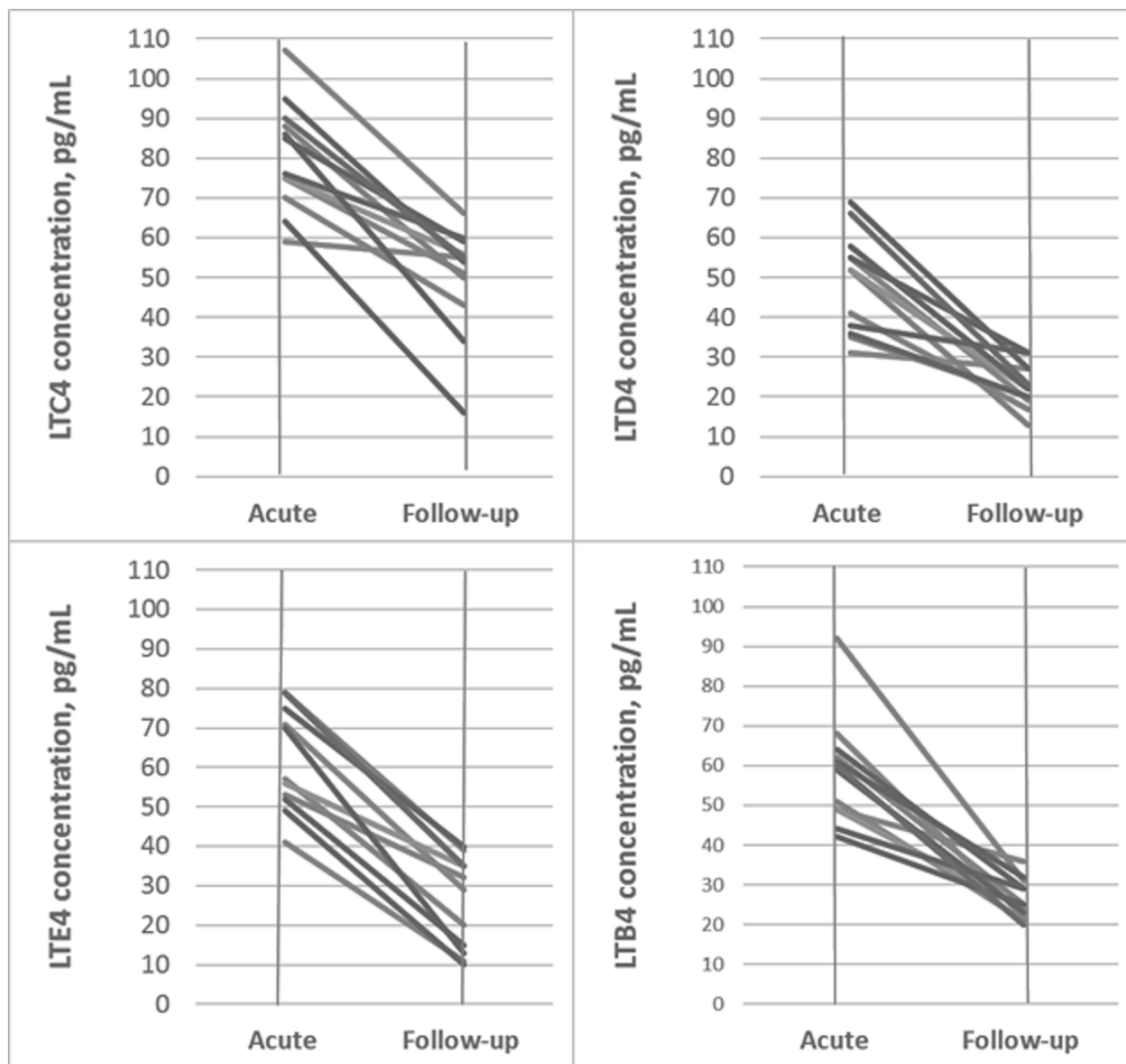
\* po vyloučení outliera zemřelého na jaterní selhání způsobeného alkoholovou cirhózou dva měsíce po přijetí do nemocnice.

\*\* normalní referenční hodnoty zdravých dospělých osob v krevním séru pro LTC<sub>4</sub>: 38,0 $\pm$ 19,0 pg/mL, pro LTD<sub>4</sub>: 20,9 $\pm$ 2,0 pg/mL, pro LTE<sub>4</sub>: 13,6 $\pm$ 6,6 pg/mL, a pro LTB<sub>4</sub>: 32,6 $\pm$ 2,1 pg/mL.

**Obrázek 5** Dynamika akutních sérových koncentrací LT během sledování v nemocnici u pacientů s akutní otravou metanolem



**Obrázek 6** Pokles sérových koncentrací LT měřených během hospitalizace (“Acute”) versus LT koncentrací měřených 2 roky po propuštění z nemocnice (“Follow-up”).



### 5.1.1.2 Kontrolní sérové koncentrace leukotrienů a výsledky klinických follow-up vyšetření

Ve skupině II („follow-up“) klinická vyšetření 3-8 měsíců a dva roky po propuštění neobjevila následky zrakové ani CNS u 17/36 (47 %) vyšetřovaných. U dalších 19 osob byly zrakové následky otravy prokázány v 5 případech, následky CNS v pěti případech a oboje následky v 9 případech. Pacienti se zrakovými následky měli abnormální nález na zrakových evokovaných potenciálech a RNFL, patologický nález na očním pozadí a perimetru. U 14 pacientů s MR známkami poškození CNS byly u 8 pacientů přítomny nekrózy putamen, u 5 nekrózy nucleus pallidus a u 4 subkortikální hemoragické nekrózy. Dva roky po dimisi z nemocnice se kontrolní sérové koncentrace leukotrienů nelišily u pacientů s následky a bez následků otravy metanolem. Pokles maximálních sérových koncentrací je zachycen na obrázku 6. Follow-up koncentrace leukotrienů nekorelovaly s koncentracemi měřenými v akutní fázi otravy ani s výsledky laboratorních a klinických vyšetření.

### 5.1.1.3 Diskuze

Naše výsledky naznačují, že neuroinflamace zprostředkovaná leukotrieny, hraje důležitou roli v mechanismech toxického poškození mozku u akutních otrav metanolem u lidí. Pacienti s akutní otravou metanolem měli signifikantně vyšší koncentrace cys-LTs a LTB<sub>4</sub> v periferní krvi než přeživší vyšetřovaní dva roky po propuštění z nemocnice. Během hospitalizace měli pacienti, kteří přežili otravu, vyšší akutní koncentrace všech měřených leukotrienů než ti, kteří zemřeli. Přeživší se špatnou prognózou měli nižší akutní sérové koncentrace leukotrienů než ti, kteří přežili s lepší prognózou bez následků, ale vyšší koncentrace než zemřelí. Signifikantní asociace mezi akutními sérovými koncentracemi leukotrienů a prognózou intoxikace indikuje neuroprotektivní účinek mírného vzestupu sérových koncentrací leukotrienů. Dle výsledků následného měření dva roky po otravě lze konstatovat, že akutní elevace koncentrací leukotrienů měla mírný, adaptivní, transitorní charakter a nebyla následována chronickou neurozánětlivou reakcí.

Patofyziologické mechanismy poškození CNS během akutní otravy metanolem jsou dost komplexní a dosud nebyly plně objasněny. Kyselina mravenčí, hlavní toxický metabolit metanolu zprostředkovává buněčnou toxicitu inhibicí cytochrom c oxidázy, což poškozuje využití kyslíku a dále způsobuje „přesmyk“ z aerobního na anaerobní metabolismus [McMartin et al., 1975; Hubacek et al., 2015]. Pokud je alkoholdehydrogenáza blokována antidotem (etanol/fomepizol), kyselina mravenčí je efektivně eliminována hemodialýzou

s poločasem 1,6 – 3,6 hod a acidóza je korigována během prvních hodin hospitalizace [Zakharov et al., 2014c; 2016b]. Kyselina mravenčí je zodpovědná i za další negativní účinky – ischemii, otok, poškození hematoencefalické bariéry, hemoragie, reaktivní oxidativní poškození, demyelinizaci, neurodegeneraci, apoptózu neuronů. Neuroinflamace je výsledkem vnitřní imunitní aktivace v mozku a je univerzální odpovědí CNS na poranění [Lagraoui et al., 2012; Shuhmann et al., 2003]. Po aktivaci, při poranění mozku, mikroglie začínají produkovat mediátory zánětu včetně LTA4 a LTB4 [Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004]. Astrocyty produkují LTB4 a všechny cys-LTs [Farias et al., 2007].

Ve zdravé mozkové tkáni se leukotrieny v podstatě nevyskytují [Farias et al., 2009]. Nicméně, koncentrace všech leukotrienů jsou elevovány a leukotrienové receptory upregulovány v mozku po poranění, či ischemii [Ciceri et al., 2001; Zhang et al., 2004]. V experimentálních studiích bylo prokázáno, že specifické proteiny z mozku v těchto situacích unikají do periferní cirkulace poškozenou hematoencefalickou bariérou a glymfatickým systémem [Blood et al., 2015; Plog et al., 2015].

V naší studii vykazovala dynamika sérových koncentrací leukotrienů skoro lineární vzestup vrcholící 4. až 5. den observace v nemocnici následovaný postupným poklesem během druhého týdne po přijetí do nemocnice. V experimentálních pokusech byl vzestup koncentrace leukotrienů velmi rychlý, dosahující maxima za 1-3 hodiny po poranění [Voigt et al., 2012]. V naší studii nebylo během prvního dne hospitalizace dosaženo žádného peaku. Může to být vysvětleno rozdílným mechanismem poranění mozku. V experimentálním mozkovém poranění mechanická síla přímo působí na cévy a axony, ničí neurony a glie, vede ke krvácení, kompresi tkáně, laceraci, kontuzi tkání, rozvoji několika mechanismů včetně neuroinflamace [Kochanek et al., 2009; Barkhoudarian et al., 2011]. Naše výsledky korespondují s výsledky experimentálních pokusů demonstrujících, že neurozánětlivá odpověď přetrvává několik týdnů s vrcholem koncentrací leukotrienů kolem sedmého dne po poranění mozku [Shuhmann et al., 2003; Shlosberg et al., 2010].

Závažnost metabolické acidózy při příjmu je důležitý prognostický parametr u akutních otrav metanolem [Paasma et al., 2012]. Existuje silná korelace mezi stupněm acidózy a pravděpodobností dlouhodobých následků zrakových a CNS [Paasma et al., 2007; Hovda et al., 2005; Zakharov et al., 2015b]. V naší studii akutní sérové koncentrace leukotrienů negativně korelovaly se závažností acidózy – čím větší acidóza, tím nižší koncentrace leukotrienů. Tyto výsledky mohou naznačovat, že leukotrieny řízená odpověď imunitního systému v mozku byla u pacientů s těžkou acidózou inhibována.

Nízké akutní sérové koncentrace leukotrienů byly spojené s horší prognózou. Zemřelí měli nejnížší koncentrace leukotrienů. U přeživších bez následků byly koncentrace vyšší než u přeživších s následky. To naznačuje protektivní efekt neuroinflammace. Koncentrace etanolu v séru pacientů při příjmu do nemocnice byla pozitivně spojena s koncentrací LTC<sub>4</sub>. Osoby s pozitivní sérovou koncentrací etanolu při příjmu mají lepší prognózu otravy metanolem [Zakharov et al., 2016a,b].

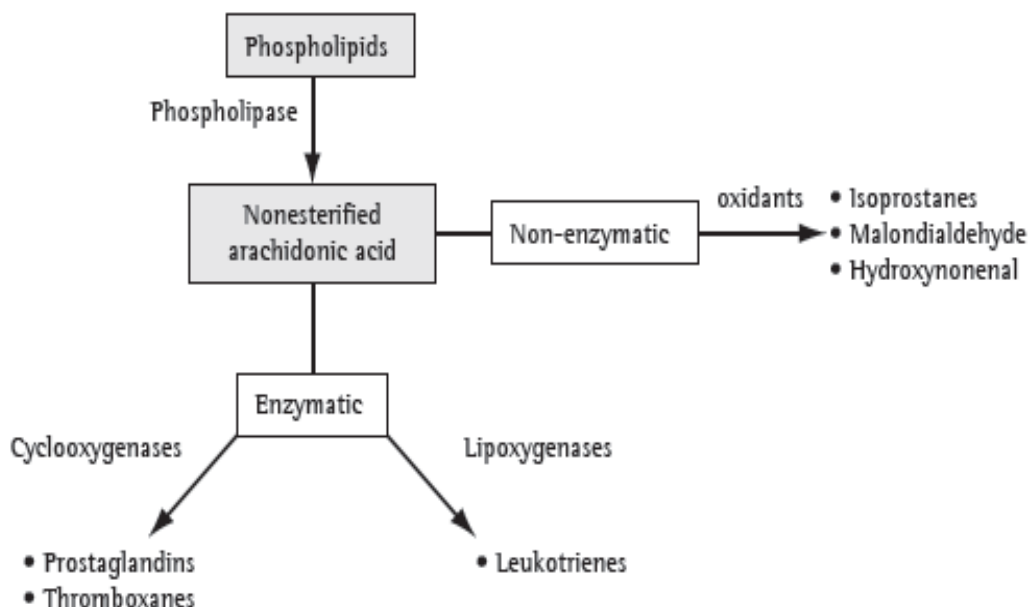
V naší studii nebyly zaznamenány případy přetrvávající elevace sérových koncentrací leukotrienů dva roky po propuštění z nemocnice. Rozdíly v sérových koncentracích leukotrienů mezi přeživšími bez následků a s následky ve follow-up skupině nebyly signifikantní. Follow-up sérové koncentrace nekorelovaly ani s laboratorními, ani s klinickými akutními parametry otravy, koncentrace leukotrienů byly již ve stejných mezích jako u zdravých lidí [Zakharov et al., 2016b]. Výsledky naší studie naznačují, že leukotrieny řízená akutní neurozánětlivá reakce u pacientů přeživších otravu odeznívá a nepřechází do chronicity.

### ***5.1.2 Lipoperoxidace (Publikace II)***

Oxidativní poškození je důsledkem nerovnováhy redukce/oxidace směrem k oxidaci, což vede ke změnám struktury a funkce makromolekul – lipidů, nukleových kyselin, proteinů. Výsledkem oxidativního poškození může být až apoptóza a smrt buňky [Calabrese et al., 2006 a,b]. Nicméně mírný oxidační stres může mít i pozitivní efekt [Bell et al., 2011]. Velmi citlivé k oxidačnímu stresu jsou neurony, protože mají slabou antioxidační ochranu [Halliwell et al., 2001]. Membrány neuronů obsahují vysoce nenasycené mastné kyseliny, které jsou extrémně náchylné k lipoperoxidaci. Výsledkem této reakce jsou isoprostany a reaktivní aldehydy jako malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-trans-2-hexenal (HHE), a 4-hydroxynonenal (HNE) [Halliwell et al., 2007].

Proces lipoperoxidace membránových lipidů je blízce příbuzný syntéze eikosanoidů (prostaglandinů, tromboxanů, leukotrienů, lipoxinů etc.), což jsou klíčové signální molekuly produkované z kyseliny arachidonové (obrázek 7) enzymatickou i neenzymatickou cestou [Zhang et al., 2002].

**Obrázek 7** MTB kyseliny arachidonové; působením oxidačního stresu vznikají reaktivní aldehydy, enzymaticky vznikají prostaglandiny a leukotrieny [Cavalcante Matos A.G., 2009]



V experimentálních pokusech bylo potvrzeno, že biomarkery mozkového poranění a mediátory neuroinflammace se dostávají do periferní cirkulace poškozenou hematoencefalickou bariérou nebo přes glymfatický systém a mohou tak být přímo měřeny v krevním séru [Plog et al., 2015].

V naší studii jsme měřili akutní koncentrace a dynamiku markerů lipoperoxidace – HHE, HNE, MDA v periferním krevním séru u pacientů s akutní intoxikací metanolem. Zjistili jsme, že proces lipoperoxidace souvisí s aktivací neuroinflammace řízené leukotrieny a že markery lipoperoxidace korelovaly s koncentracemi leukotrienů (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub>), které jsme měřili v předešlé práci [Zakharov et al., 2017c]. Koncentrace stejných markerů jsme měřili o dva roky později u přeživších otravy k testování jejich asociací s dlouhodobými následky otravy ze strany CNS.

#### 5.1.2.1 Akutní sérové koncentrace markerů lipoperoxidace a jejich dynamika

Akutní koncentrace všech tří měřených markerů lipoperoxidace – HHE, HNE, MDA, byly signifikantně vyšší než koncentrace měřené dva roky po dimisi z nemocnice v rámci prospektivního sledování (obrázek 8).

Akutní sérové koncentrace HHE, HNE, MDA se signifikantně nelišily mezi přeživšími a zemřelými, zatímco akutní koncentrace cysteinyl leukotrienů byly u přeživších signifikantně vyšší (obrázek 9). Čas observace ve skupině přeživších se nelišil od času sledování u zemřelých. Akutní koncentrace všech tří měřených markerů lipoperoxidace byly vyšší u pacientů, kteří přežili otravu bez následků, než u pacientů, kteří přežili s následky ze strany CNS.

Dynamika akutních sérových koncentrací HHE, HNE, MDA je znázorněna na obrázku 10. U všech měřených markerů byla stupňovitá elevace akutních koncentrací, bez peaku nebo poklesů během doby sledování. Rychlost vzestupu u akutních sérových koncentrací markerů lipoperoxidace byla přibližně 0,49 ng/mL/h. Akutní koncentrace markerů lipoperoxidace negativně korelovaly s hodnotou anionového gapu, laboratorním parametrem závažnosti metabolické acidózy, a pozitivně pak korelovaly s akutními sérovými koncentracemi leukotrienů. Nebyla prokázána asociace mezi HHE, HNE, MDA a věkem, pohlavím, časem mezi požitím metanolu a příjmu do nemocnice, sérovou koncentrací metanolu, etanolu, kyseliny mravenčí, glukózy a kreatininu (tabulka 3). Pacienti, kteří dostali v prehospitální období etanol, měli vyšší sérové koncentrace MDA.

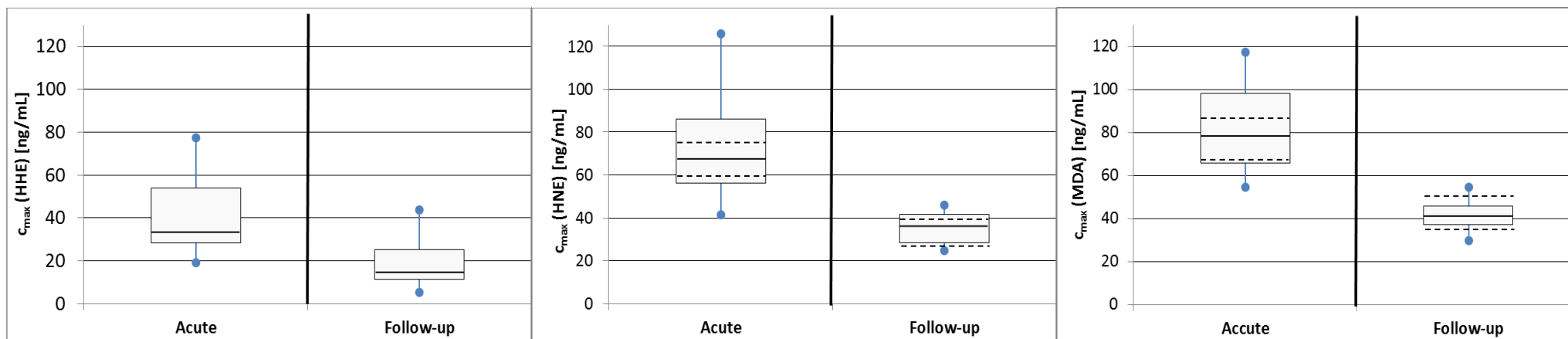
Následné sérové koncentrace měřených markerů lipoperoxidace nekorelovaly s akutními koncentracemi ani s koncentracemi leukotrienů. Ve sledovaném souboru nebyly pozorovány případy s perzistentní elevací markerů lipoperoxidace dva roky po otravě. Koncentrace všech měřených markerů lipoperoxidace klesly ve všech případech o 50-55 % a vrátily se zpět do referenčních limitů (obrázek 11).



**Tabulka 3** Pearsonova korelace koncentrací akutních sérových lipidových markerů oxidačního stresu a akutních koncentrací sérových leukotrienů.

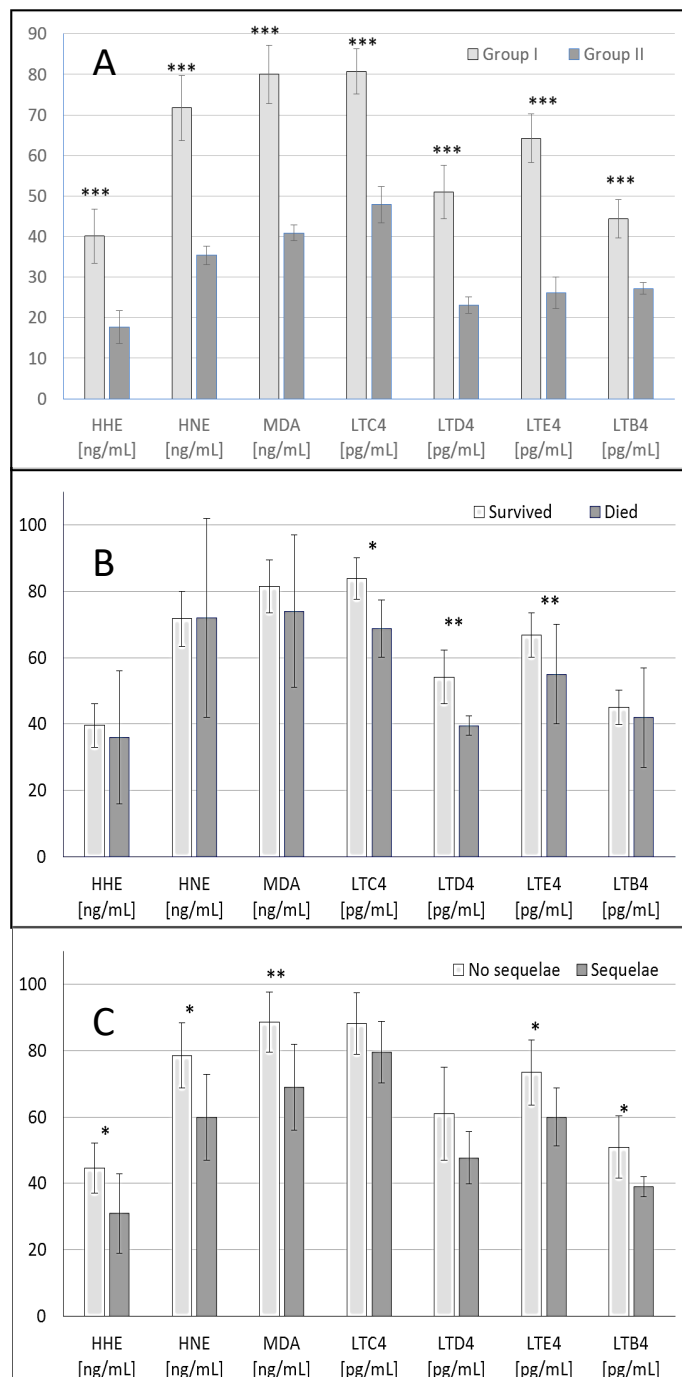
		<b>HHE</b> [ng/mL]	<b>HNE</b> [ng/mL]	<b>MDA</b> [ng/mL]	<b>LTC4</b> [pg/mL]	<b>LTD4</b> [pg/mL]	<b>LTE4</b> [pg/mL]	<b>LTB4</b> [pg/mL]	<b>AG</b> [mmol/L]
<b>HHE</b> [ng/mL]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N								
<b>HNE</b> [ng/mL]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N	0,955** <b>0,000</b> 28							
<b>MDA</b> [ng/mL]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N	0,927** <b>0,000</b> 28	0,928** <b>0,000</b> 28						
<b>LTC4</b> [pg/mL]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N	0,713** <b>0,000</b> 28	0,663** <b>0,000</b> 28	0,785** <b>0,000</b> 28					
<b>LTD4</b> [pg/mL]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N	0,676** <b>0,000</b> 28	0,608** <b>0,001</b> 28	0,735** <b>0,000</b> 28	0,747** <b>0,000</b> 28				
<b>LTE4</b> [pg/mL]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N	0,819** <b>0,000</b> 28	0,771** <b>0,000</b> 28	0,814** <b>0,000</b> 28	0,856** <b>0,000</b> 28	0,794** <b>0,000</b> 28			
<b>LTB4</b> [pg/mL]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N	0,746** 0,000 28	0,717** 0,000 28	0,674** 0,000 28	0,685** 0,000 28	0,395* 0,038 28	1,000 0,000 28		
<b>AG</b> [mmol/L]	Korelační koeficient Sig. (2-tailed) N	-0,428** <b>0,026</b> 28	-0,388** <b>0,045</b> 28	-0,334** <b>0,026</b> 28	-0,507** <b>0,006</b> 28	-0,501* <b>0,007</b> 28	-0,511* <b>0,005</b> 28	-0,478 <b>0,010</b> 28	

**Obrázek 8** Krabicové grafy sérových koncentrací markerů lipoperoxidace měřených za hospitalizace (Acute) a u přeživších dva roky po propuštění z nemocnice (Follow up).



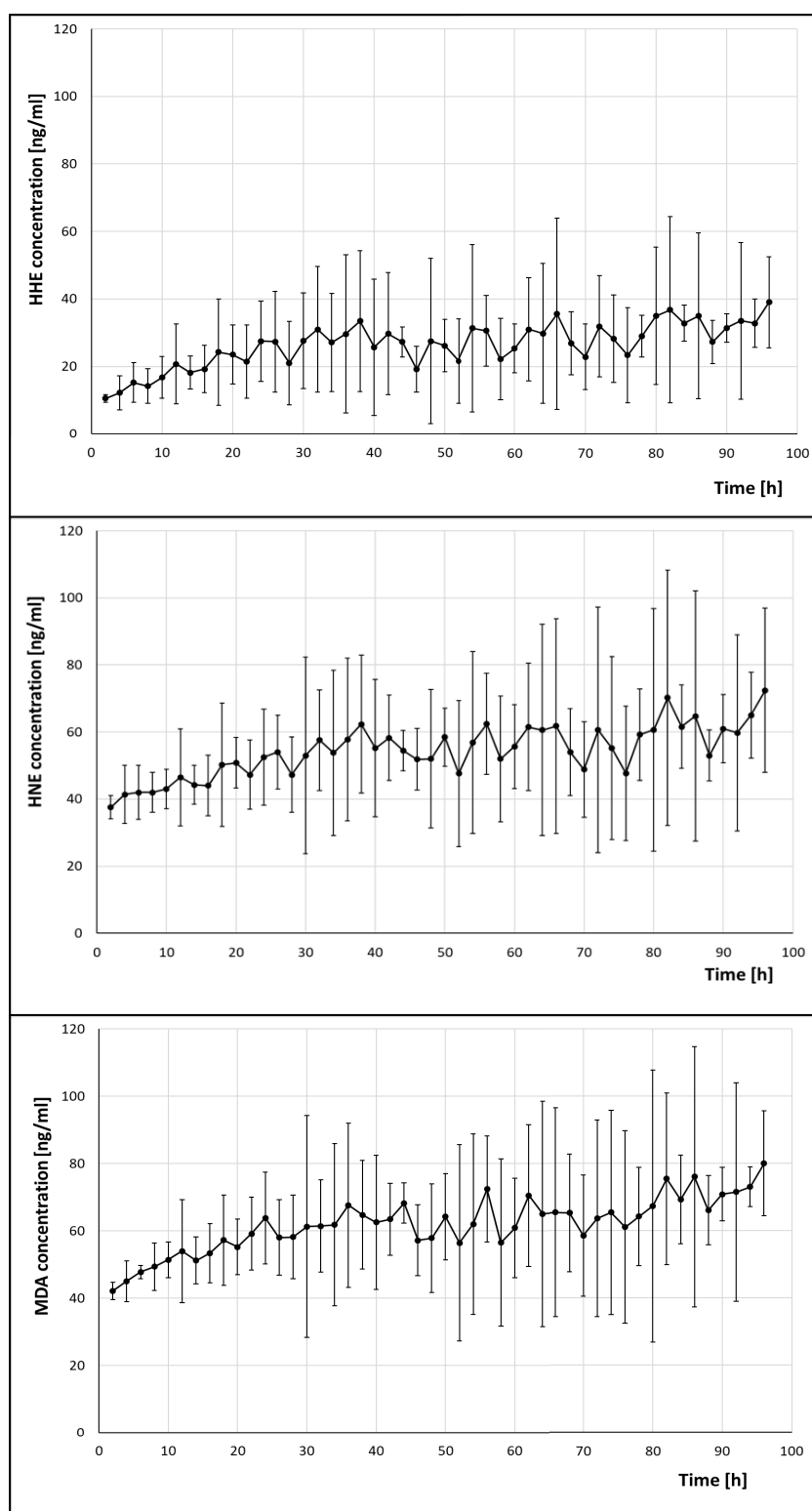
Poznámky: Acute C<sub>max</sub> – maximální sérové koncentrace měřené během hospitalizace; Průměr – tečkovaná linka, standardní chyba průměru (SEM, box), 95% CI od průměru jsou prezentovány p < 0,001.

**Obrázek 9** Sérové koncentrace markerů lipoperoxidace a leukotrienů měřené za hospitalizace a u přeživších dva roky po otravě (A), u přeživších versus zemřelých za hospitalizace (B) a u přeživších s následky versus přeživších bez následků (C)

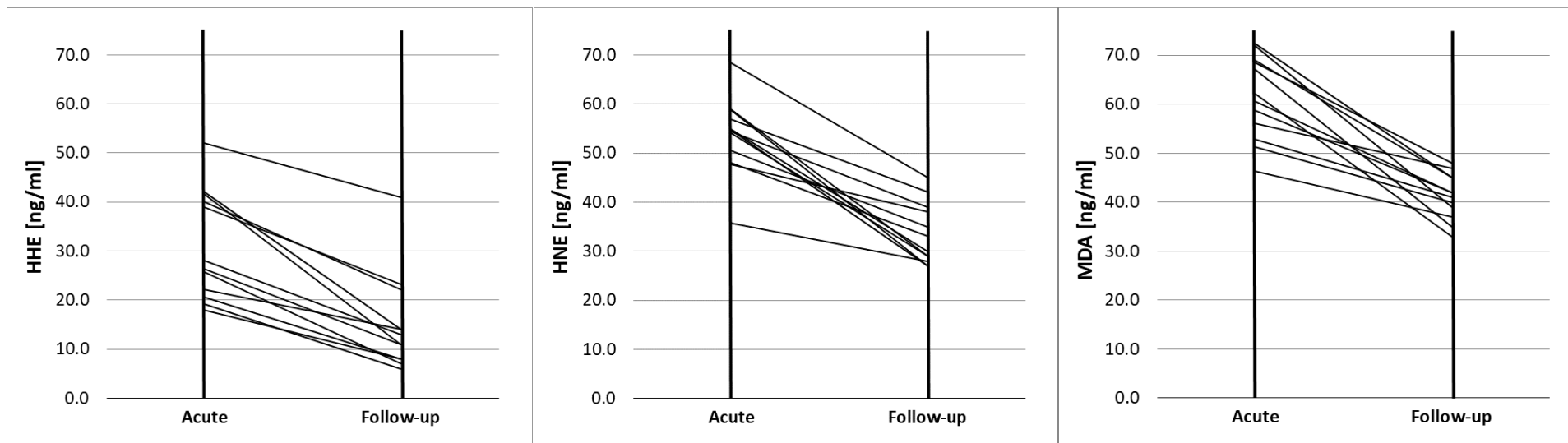


Poznámky: průměr  $\pm$  95% CI. LTB4, LTC4, LTD4, LTE4: cysteinyl-leukotrieny LTB4, BLTC4, LTD4, LTE4; HHE: 4-hydroxy-trans-2-hexenal; MDA: malondialdehyd; HNE: 4-hydroxynonenal; No sequelae – pacienti přeživší otravu bez následků; Sequelae – pacienti přeživší otravu s dlouhodobými zdravotními následky; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

**Obrázek 10** Dynamika změn akutních sérových koncentrací markerů lipoperoxidace během observace v nemocnici u pacientů s otravou metanolem



**Obrázek 11** Pokles sérových koncentrací markerů lipoperoxidace měřených během akutní otravy (Acute) versus měřených dva roky po propuštění z nemocnice u stejných pacientů (Follow-up)



### 5.1.2.2 Diskuze

Výsledky naší studie demonstrují, že aktivace membránové lipoperoxidace a její interakce s leukotrieny zprostředkovanou neuroinflamací hrají důležitou roli v mechanismech toxického poškození mozku u akutních otrav metanolem. Akutní sérové koncentrace markerů lipoperoxidace byly signifikantně elevované u pacientů během hospitalizace v porovnání s koncentracemi měřenými dva roky po propuštění z nemocnice.

Akutní koncentrace všech tří markerů demonstrovaly stupňovitý vzestup během prvních 3-4 dnů po příjmu do nemocnice. Tyto akutní koncentrace pozitivně korelovaly s akutními sérovými koncentracemi leukotrienů a negativně korelovaly se závažností metabolické acidózy při příjmu. Pacienti s lepší klinickou prognózou měli relativně vyšší koncentrace měřených lipoperoxidových markerů než ti se špatnou prognózou. Elevace v koncentraci těchto markerů byla pouze dočasná a nepokračovala do chronických změn. Sérové koncentrace HHE, HNE, MDA měřené během následné prospektivní studie neměly asociaci s akutními laboratorními parametry intoxikace, s follow up koncentracemi leukotrienů, ani s následky otravy.

Interakce mezi přímým cytotoxickým účinkem kyseliny mravenčí – hlavního toxického metabolitu metanolu, aktivací membránové lipoperoxidace a neuroinflamace zahrnuje komplexní mechanismy, které nejsou ještě zcela objasněny [McMartin et al., 1975]. Acidóza vzniká vlivem nahromadění kyselin mravenčí a mléčné vede k poškození hematoencefalické bariéry, dilataci malých mozkových cév a k edému mozku [Lock et al., 2013]. Na buněčné úrovni dochází k inhibici cytochrom c oxidázy a ke snížení syntézy adenosintriphosphátu, to vede k influxu sodíku a vápníku do neuronů, neuronální hyperexcitaci a edému, zvýšené produkci reaktivních kyslíkových radikálů a toxických aldehydů v procesu lipoperoxidace, to vše může za určitých podmínek vyústit až v apoptózu a smrt buňky [Liesivuori et al., 1991].

Peroxidace lipidů je jeden z časných nespecifických protektivních mechanismů podílející se na aktivaci mikroglií a astrocytů, spouštění neuroinflamace u akutního traumatického i netraumatického poranění mozku – cévní mozková příhoda, hypoxie, ischemie [Dalle Donne et al., 2006]. Produkty lipoperoxidace nejsou specifické pouze pro otravu metanolem. V naší studii jsme objevili signifikantní asociace mezi zvýšenými koncentracemi markerů lipoperoxidace a leukotrienů zprostředkujících neuroinflamaci, závažností otravy a prognózou. Lipoperoxidace membrán neuronů může na buněčné úrovni hrát jak protektivní, tak destruktivní roli. Výsledek záleží na intenzitě a interakci s dalšími procesy – syntézou eikosanoidů, aktivací mikroglií a neuroinflamace [Carini et al., 2004, Uchida et al., 2003].

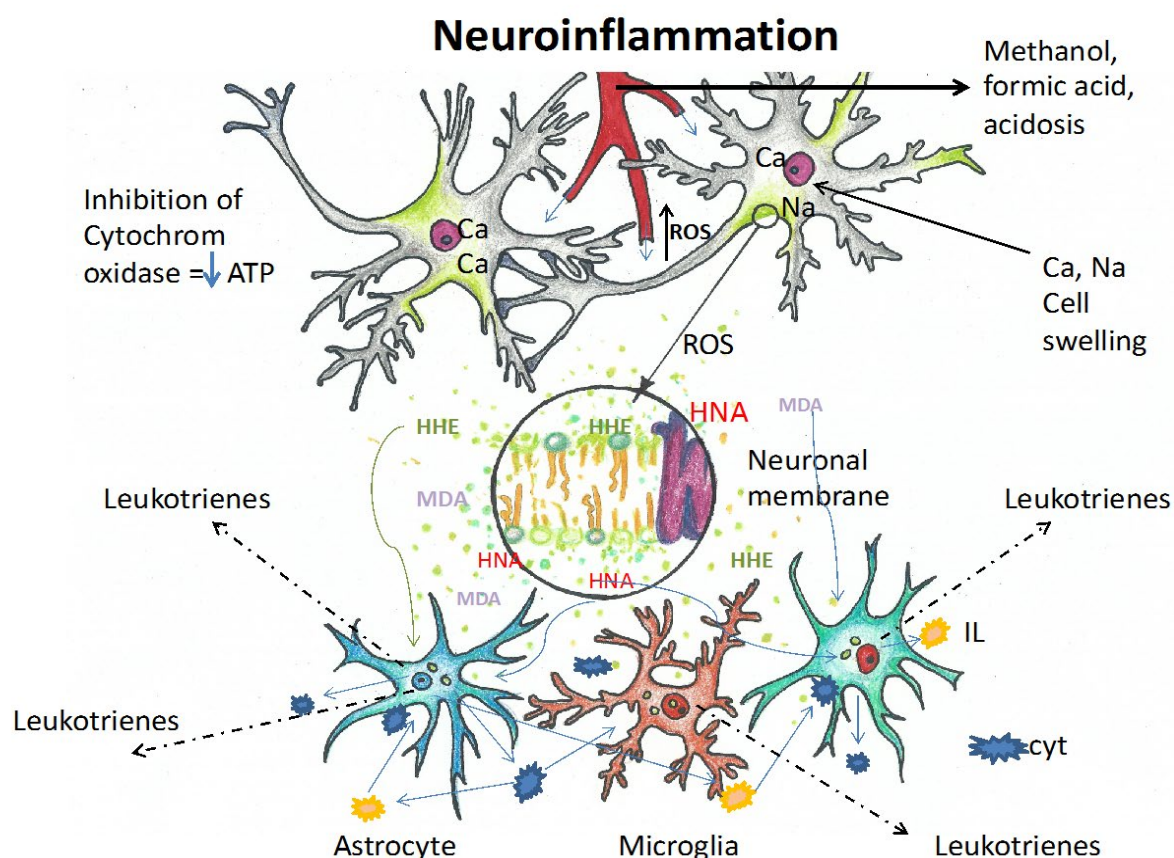
V případě závažného oxidačního stresu jsou reaktivní toxické aldehydy produkovány ve velkém množství, včetně námi studovaných HHE, HNE a MDA. Antioxidační systémy jsou saturovány, je poškozena buněčná syntéza proteinů, dochází k inhibici enzymatických systémů a přímému poškození intracelulárních makromolekul. Na druhé straně mají produkty lipoperoxidace signální efekty, indukují buněčné antioxidační systémy, mohou zastávat roli posílků a ovlivnit tak expresi určitých genů, modifikovat strukturu a funkci buněčných proteinů a změnit jejich imunologické vlastnosti [Toyokuni et al., 1995]. Například, HNE a MDA stimulují aktivitu neutrofilů a indukují proliferaci astrocytů nezbytnou pro demarkaci poškozených tkání [Carini et al., 2004; Uchida et al., 2003; Esterbauer et al., 1991]. Konečný efekt produkce reaktivních aldehydů záleží na závažnosti akutního poškození, na síle a době trvání oxidačního stresu, na charakteru imunitní odpovědi. Interakce mezi těmito faktory determinuje, zda bude výsledný mechanismus protektivní nebo destruktivní.

Jeden z hlavních scavengerů toxických aldehydů, který se nachází v mozkových neuronech, je mitochondriální ALDH2. Aktivita tohoto enzymu je indukována produkty oxidace alkoholu a zvýšená exprese ALDH2 genu efektivně chrání buňky proti oxidačnímu stresu [Li Sy et al., 2006]. Další molekuly s antioxidačními vlastnostmi v mozku zahrnují superoxid dismutázu, glutathion, glutathion peroxidázu, proteiny vázající kovy, alfa tokoferol, ubiquinol, carnosin [Halliwell et al., 2001, 1999]. V porovnání s ostatními orgány obsahuje mozková tkáň relativně vysoké koncentrace askorbátu s prokázaným antioxidačním efektem [Rice Evans et al., 1989].

Akutní otrava metanolem způsobuje produkci HHE, HNE a MDA vlivem peroxidace lipidů. Tento proces je spjat se zvýšenou syntézou leukotrienů. Tento fakt naznačuje, že mechanismus neuroinflammace je spuštěn právě poškozením membrán neuronů a aktivován produkty lipoperoxidace. Leukotrieny jsou mediátory zánětu, tudíž i neuroinflammace. Za normálních podmínek se v mozku nevyskytují, jsou produkovány aktivovanými buňkami mikroglie a astrocyty v různých kritických situacích, jako je mozková hypoxie, hypoglykemie, poranění hlavy, epileptický záchvat, cévní mozková příhoda. Existují studie, které demonstrují, že pacienti s cévní mozkovou příhodou mají zvýšené sérové koncentrace MDA. Tato elevace trvala přinejmenším 7 dnů po příjmu do nemocnice. Koncentrace naměřené v akutním stadiu mozkové příhody byly několikrát vyšší než koncentrace naměřené u zdravých kontrol [Polidori et al., 2002]. Koncentrace MDA korelovaly s velikostí nekrotické léze, tíží klinického stavu, prognózou [Garibala et al., 2002].

S ohledem na interakce mezi patofyziologickými mechanismy peroxidace membránových lipidů a neuroinflamace zprostředkované leukotrieny mohou určité biochemické enzymatické a neenzymatické mechanismy propojit tyto dva procesy. Hlavní prekurzor HNE u člověka je 13-hydroperoxyoctadecadienová kyselina. Ta vzniká oxidací kyseliny linoleové účinkem 15-lipoxygenázy-1 a 15-hydroperoxyeicosatetraenové kyseliny, produkované oxidací arachidonové kyseliny 15-lipoxygenasou-2 [Riahi et al., 2010; Schneider et al., 2001]. Obě sloučeniny mají krátký poločas a katabolizují se do různých rodin více stabilních sloučenin, například do leukotrienů [Massey et al., 2011]. Tyto biochemické mechanismy transformace společných prekursorů mohou vysvětlovat silnou pozitivní asociaci mezi akutními koncentracemi markerů lipoperoxidace a leukotrieny. Schema neurozánětlivé reakce je na obrázku 12.

**Obrázek 12** Schéma mechanismů neuroinflamace v případě toxického poškození mozku



V naší studii měla dynamika změn koncentrace markerů peroxidace stupňovitý charakter během observace, trvala déle než 80 hodin a nebyly zachyceny vrcholy/peaky. Ačkoliv metanol a kyselina mravenčí byly typicky eliminovány během prvních 24-48 hodin



hospitalizace eliminačními metodami, kyselina mravenčí může působit jako spouštěč aktivující pomalejší mechanismy netraumatického poranění mozku – neuroinflamace, která typicky kulminuje 3. až 4. den po příjmu do nemocnice. Na zvířecích modelech akutní intoxikace zvýší enzymatické antioxidační systémy svou aktivitu okamžitě po vystavení toxické látky, jako první reakce na vzniklý oxidační stres. Nicméně o pár dní později aktivita antioxidační ochrany klesá na jednu třetinu kvůli postupému snižování produkce adenosintrifosfátu. Markery oxidativního poškození biologických makromolekul se pak začínají tvořit ve větším množství [Parthasarathy et al., 2006]. Naše výsledky jsou v souladu s experimentálními daty.

V naší studii korelovaly akutní koncentrace markerů lipoperoxidace s aniontovým oknem – indikátorem závažnosti metabolické acidózy – při příjmu do nemocnice. Je známo, že závažnost metabolické acidózy je jedním z hlavních prognostických faktorů spojených s prognózou akutní intoxikace metanolem [Paasma et al., 2012].

Rozdíly v akutních sérových koncentracích markerů lipoperoxidace mezi přeživšími a zemřelými nebyly signifikantní, na rozdíl od koncentrací leukotrienů, které byly vyšší u přeživších [Zakharov et al., 2017b]. Pacienti, kteří přežili otravu s následky ze strany CNS, měli podobné akutní sérové koncentrace HHE, HNE, MDA jako zemřelí. Nízký stupeň lipoperoxidace může být insuficientní pro indukci protektivní neurozánětlivé reakce u pacientů s horší prognózou. Další faktory, jako mozková ischemie, hyperexcitace hypoxických neuronů, může hrát roli v prognóze u těchto pacientů. Na druhou stranu, přeživší bez následků měli akutní koncentrace HHE, HNE a MDA signifikantně vyšší. Tento poznatek může opět demonstrovat protektivní roli mírného oxidačního stresu v mechanismech toxického poškození mozku u akutních intoxikací metanolem.

Je známo, že mírný oxidační stres spouští transkripci nukleárního faktoru (erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) [Bell et al., 2011]. Transkripce Nrf2 vede k aktivaci několika buněčných antioxidačních systémů, jako superoxiddismutáza a glutathion. Mírná lipoperoxidace membránových lipidů chrání neurony před oxidativním poškozením, spouští leukotrieny zprostředkovanou neurozánětlivou reakci a chrání před vznikem chronických neurodegenerativních změn. Protektivní, a dokonce léčebné efekty mírného oxidačního stresu jsou využívány v takzvané ozonové terapii, která se využívá například v terapii bolestí zad, u ortopedických onemocnění atd. [Sagai et al., 2011].

Pacienti, kterým byl již v prehospitální době podán etanol, měli vyšší akutní koncentraci MDA. Tito pacienti měli lepší prognózu než ti, kteří alkohol nedostali. To bylo

demonstrováno i v našich předchozích studiích [Zakharov et al., 2016b; 2017c]. Etanol redukuje výskyt reperfuční ischemie, brání postischemickým adhezivním interakcím mezi leukocyty a endoteliálními buňkami, brání hyperexcitaci mozkových neuronů [Wang et al., 2010; 2007; Lovinger et al., 1989].

U metanolem indukovaného poškození axonů optického nervu a sítnice přetrvává residuální peripapilární edém přibližně dva měsíce po propuštění z nemocnice a proces chronické remyelinizace trvá další dva roky [Nurieva et al., 2016; Klistorner et al., 2010]. Stejný proces může probíhat i v mozkových neuronech. Je známo, že chronická neuroinflamace a neurodegenerace s reaktivní mikroglií může přetrvávat až jeden rok po úrazovém poranění [Johnson et al., 2013]. V naší studii jsme nepozorovali žádné případy perzistence elevace markerů lipoperoxidace v populaci přeživších dva roky po propuštění z nemocnice. Follow up koncentrace markerů HHE, HNE, MDA byly v referenčních mezích. To jen dokazuje, že procesy lipoperoxidace a neuroinflamace u otravy metanolem jsou akutní, tranzitorní a neprogredují do chronicity a neurodegenerace. Ve follow up koncentracích měřených markerů nebyly pozorovány rozdíly mezi skupinami pacientů s následky a bez následků CNS, tyto koncentrace nekorelovaly s akutními laboratorními ani klinickými parametry.

U akutních otrav metanolem hraje oxidační stres mírného stupně důležitou protektivní roli v mechanismech aktivace leukotrieny zprostředkované neuroinflamace. Pacienti s akutní otravou měli signifikantně vyšší akutní sérové koncentrace markerů lipoperoxidace v séru než přeživší otravu za dva roky po propuštění z nemocnice. Pacienti s horší prognózou měli akutně měřené koncentrace markerů lipoperoxidace nižší než pacienti s dobrou prognózou. Akutní lipoperoxidace membránových lipidů byla tranzitorní a nebyla následována chronickou neurodegenerací.

### ***5.1.3 Reaktivní karbonylové radikály, karbonylový stres u akutní otravy metanolem (Publikace III)***

Současně s měřením sérových koncentrací markerů lipoperoxidace v rámci studie role oxidačního stresu byly stanoveny akutní sérové koncentrace dalších reaktivních aldehydů, analýza těchto dat ověřila a potvrdila závěry ze studie o lipoperoxidaci u akutních otrav metanolem. Mitochondriální dysfunkce vyvolaná kyselinou mravenčí vede k mohutné produkci reaktivních kyslíkových radikálů a toxických aldehydů, které mohou poškozovat

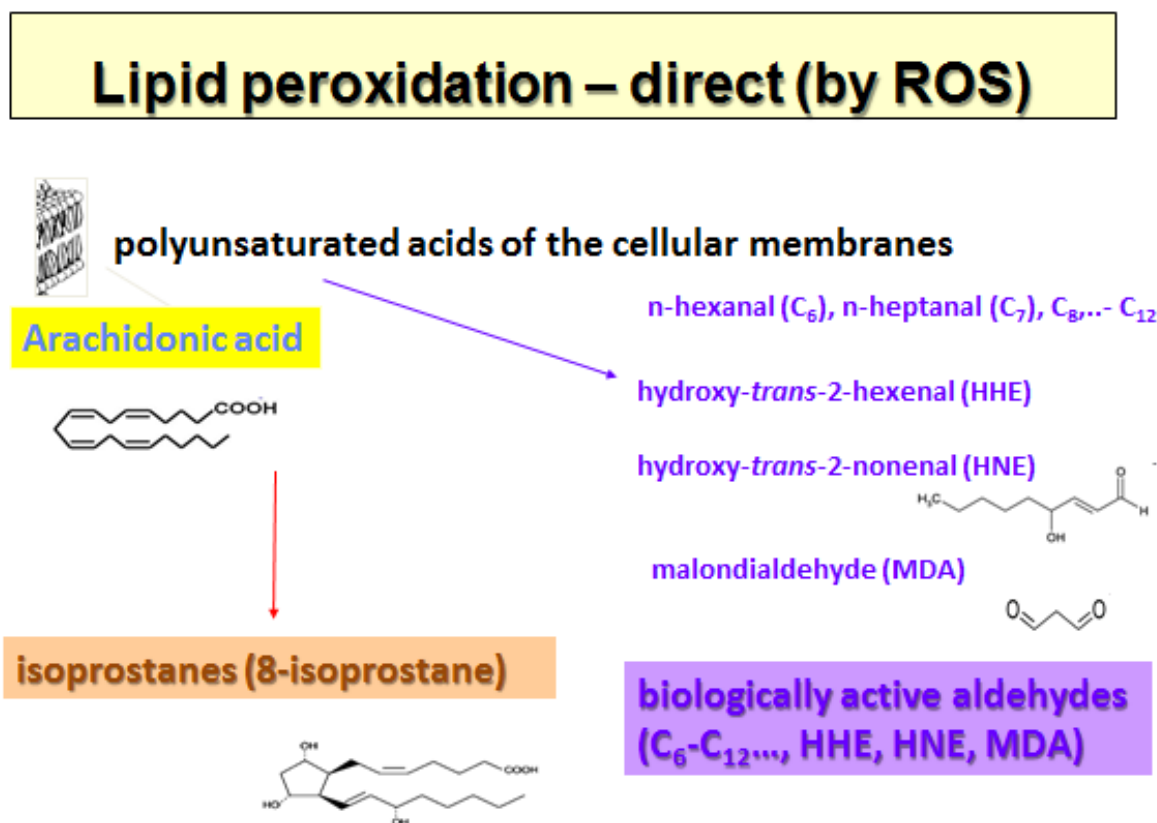
klíčové buněčné struktury [Lin et al., 2006]. Zvýšená produkce kyslíkových radikálů vede ke zvýšené syntéze reaktivních karbonylových radikálů, které spouští tzv. karbonylový stres [Semchyshyn et al., 2011]. Reaktivní karbonylové sloučeniny jsou produkovány v malých množstvích i během normálních buněčných metabolických pochodů [Peng et al., 2011; Uribarri et al., 2010]. Hlavním zdrojem reaktivních karbonylových aldehydů je degradace membránových lipidů [Halliwell et al., 1989]. Za určitých podmínek tyto sloučeniny mohou zastávat roli signálních molekul a buněčných poslíčků a účastnit se protektivních neurozánětlivých reakcí v poškozeném mozku [Semchyshyn et al., 2014]. Na druhou stranu jsou tyto reaktivní substance velmi reaktivní a schopné poškodit biologické makromolekuly [Semchyshyn et al., 2014]. Schéma syntézy reaktivních aldehydů je na obrázku 13.

Reaktivní karbonylové molekuly představují velkou skupinu biologicky aktivních aldehydů a dialdehydů, nasycených i nenasycených, přičemž nenasycené jsou typicky více reaktivní [Uchida et al., 2000; Pamplona et al., 2011]. Tyto molekuly mají delší eliminační poločas než ROS a jsou stabilnější. Větší stabilita jim umožňuje dostat se do hlubších nitrobuněčných prostor [Halliwell et al., 1989]. Mírná intenzita karbonylového stresu může mít opět protektivní efekt, protože tyto molekuly se podílejí na mechanismech buněčné adaptace a regenerace [Bell et al., 2011; Sagai et al., 2011]. Avšak je známo, že reaktivní karbonylové aldehydy se podílejí na patogenezi řady onemocnění – obezity, diabetes mellitus, aterosklerózy a chronické neurodegenerace [Uttara et al., 2009]. Karbonylový stres hraje zásadní roli v patogenezi glykace proteinů [Halliwell et al., 1989].

V rámci studie jsme měřili akutní a následné koncentrace reaktivních aldehydů C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> v periferním krevním séru u pacientů s otravou metanolem. Akutní sérové koncentrace C<sub>6</sub> – C<sub>12</sub> reaktivních karbonylových aldehydu měřených při přijetí do nemocnice a během hospitalizace byly signifikantně vyšší než následné koncentrace těchto aldehydů. U pacientů přeživších otravu byly sérové koncentrace C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>12</sub> vyšší než u zemřelých v nemocnici (tabulka 4). Byla prokázána významná asociace mezi závažností metabolické acidózy, vyjádřené pomocí anionového gapu, a akutní koncentrací měřených reaktivních karbonylových složek:  $r = -0,39$ ;  $p = 0,046$  pro C<sub>6</sub>;  $r = -0,42$ ;  $p = 0,035$  pro C<sub>7</sub>;  $r = -0,48$ ;  $p = 0,012$  pro C<sub>8</sub>;  $r = -0,39$ ;  $p = 0,046$  pro C<sub>9</sub> a  $r = -0,47$ ,  $p = 0,015$  pro C<sub>11</sub>. Nebyla nalezena asociace mezi měřenými koncentracemi uvedených aldehydů a věkem, pohlavím a časem mezi otravou metanolem a hospitalizací, jakož i sérovou koncentrací metanolu při přijetí. Všechny měřené akutní koncentrace reaktivních karbonylových složek pozitivně korelovaly

se zvýšenými sérovými koncentracemi leukotrienu  $\text{LTB}_4$  a cysteinyl leukotrienů  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  a  $\text{LTE}_4$  (všechny  $p < 0,05$ ).

**Obrázek 13** Produkce biologicky aktivních aldehydů z kyseliny arachidonové neenzymatickou cestou [Pelclova et al., 2017]



Následné sérové koncentrace reaktivních karbonylových aldehydů měřené v rámci prospektivního sledování nekorelovaly s akutními koncentracemi a laboratorními parametry měřenými při příjmu do nemocnice. Nebyla pozorována asociace mezi následnými koncentracemi měřených biomarkerů a biochemickými laboratorními parametry měřenými při kontrolních vyšetřeních. Akutní elevace sérových koncentrací  $\text{C}_6$  –  $\text{C}_{12}$  reaktivních karbonylových aldehydu byla tranzitorní a nepřecházela do chronicity.

**Tabulka 4** Sérové koncentrace reaktivních karbonylových aldehydů měřených během hospitalizace s akutní otravou metanolem (Group I, “Acute”) a u pacientů přeživších otravu dva roky po propuštění z nemocnice (Group II, “Follow-up”).

	<b>C<sub>6</sub></b> [ng/mL]	<b>C<sub>7</sub></b> [ng/mL]	<b>C<sub>8</sub></b> [ng/mL]	<b>C<sub>9</sub></b> [ng/mL]	<b>C<sub>10</sub></b> [ng/mL]	<b>C<sub>11</sub></b> [ng/mL]	<b>C<sub>12</sub></b> [ng/mL]
<b>Group I (28)</b>	36,4±4,8	38,9±5,0	18,8±3,9	36,5±3,9	6,1±0,4	13,6±3,0	7,8±0,4
<b>Group II (36)</b>	21,6±5,2	17,0±2,0	4,0±0	19,0±3,0	4,0±0	3,7±0,6	4,7±0,4
<b>p<sub>I/II</sub></b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Died</b>	28,3±1,7	33,7±5,9	11,8±1,2	31,8±3,8	5,7±0,8	10,5±6,5	7,3±0,5
<b>Survived</b>	38,6±5,9	40,4±6,2	20,7±4,7	37,7±4,8	6,2±0,5	14,5±3,6	7,9±0,6
<b>p<sub>died/survived</sub></b>	<b>0,002</b>	0,089	<b>0,001</b>	<b>0,042</b>	0,363	0,218	<b>0,022</b>
<b>Sequelae</b>	38,1±6,7	40,3±7,0	20,2±5,3	37,6±5,1	6,2±0,6	15,3±4,0	7,9±0,6
<b>No sequelae</b>	40±17	41±18	22±14	38±16	6,3±1,4	13±11	8,1±1,5
<b>p<sub>seq/no seq</sub></b>	0,779	0,958	0,770	0,929	0,849	0,563	0,697

## **5.2 Oxidativní poškození nukleových kyselin a proteinů u akutní otravy metanolem (Publikace IV)**

Středně těžký až těžký oxidační stres může vést k poškození nukleových kyselin, zejména mitochondriální deoxyribonukleové a mitochondriální ribonukleové kyseliny. Děje se tak několika mechanismy, například hydroxylací nukleových bazí nebo reakcemi s toxickými aldehydy [Evans et al., 2004]. Těžký oxidační stres také může vést k poškození molekul proteinů a ke konverzi enzymatických peptidů na deriváty, které jsou citlivé k proteolytické degradaci. Oxidace proteinů může mít dopady na buněčný metabolismus a vést k ireverzibilním změnám klíčových buněčných struktur [Stadtman et al., 2006].

Ačkoliv již bylo popsáno více než sto modifikací deoxyribonukleové kyseliny (DNA), jako klinické markery oxidativního poškození se používají tři: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG), 8-hydroxyguanosin (8-OHG), 5-(hydroxymethyl)uracil (5-OHMU) [Loft et al., 1999]. Jako markery oxidativního poškození proteinů se používají oxidovaný, nitrovaný a halogenovaný tyrosin (o-Tyr), nitrotyrosin (NO-Tyr), chlorotyrosin (Cl-Tyr) [Dalle Donne et al., 2006]. Na zvířecích modelech toxického poškození mozku bylo prokázáno, že tyto markery vstupují poškozenou hematoencefalickou bariérou a glymfatickým systémem do periferní cirkulace, kde mohou být měřeny jejich akutní koncentrace [Plog et al., 2015].

V naší studii jsme u pacientů s prokázanou otravou metanolem měřili akutní sérové koncentrace a následné chronické změny v koncentracích markerů oxidativního poškození proteinů – o-Tyr, NO-Tyr, Cl-Tyr a nukleových kyselin – 8-OHdG, 8-OHG a 5-OHMU (tabulka 5 a 6). Následné (follow-up) koncentrace stejných markerů byly měřeny u přeživších pacientů dva roky po propuštění z nemocnice. Pro interpretaci výsledků jsme naměřená data porovnávali s předešle měřenými markery lipoperoxidace a zánětu.

### ***5.2.1 Akutní sérové koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů a jejich dynamika***

Akutní sérová koncentrace pouze jednoho ze tří měřených markerů oxidativního poškození nukleových kyselin, 8-OHdG, a jednoho ze tří markerů oxidativního poškození proteinů, o-Tyr, byly signifikantně vyšší než jejich následovné (follow up) koncentrace. U ostatních měřených markerů nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi akutními a následnými koncentracemi.

Koncentrace dvou markerů oxidativního poškození nukleových kyselin – 8-OHdG a 8-OHG – byly u přeživších signifikantně vyšší než u zemřelých na akutní otravu v nemocnici. U 5-OHMU ani u tří měřených markerů oxidativního poškození proteinů signifikátní změny v akutních a následných koncentracích nebyly pozorovány. Pacienti, kteří přežili otravu bez následků, měli v porovnání s přeživšími s následky ze strany CNS vyšší akutní koncentrace všech tří měřených markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a jednoho markeru proteinů, o-Tyr. Změny v akutních sérových koncentracích měřených markerů nukleových kyselin a proteinů během hospitalizace jsou znázorněny na obrázku 14. Pro všechny markery platila stupňovitá elevace akutních koncentrací bez peaků nebo poklesů ve sledované době, dynamika koncentrací markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů je na obrázku 15.

Akutní koncentrace markerů oxidativního poškození proteinů korelovala s tíží metabolické acidózy vyjádřené pomocí aniontového okna (o-Tyr:  $r = -0,462$ ,  $p = 0,015$ ; NO-Tyr:  $r = -0,452$ ,  $p = 0,018$ ; Cl-Tyr:  $r = -0,387$ ,  $p = 0,046$ ). Dále byla zjištěna pozitivní korelace mezi měřenými markery oxidace nukleových kyselin a sérovou koncentrací etanolu při příjmu do nemocnice (8-OHdG:  $r = 0,493$ ,  $p = 0,009$ ; 8-OHG:  $r = 0,403$ ,  $p = 0,037$ ; 5-OHMU:  $r = 0,417$ ,  $p = 0,030$ ). Pacienti přijatí do nemocnice s nízkým Glasgow coma scale skórem nebo v kómatu měli nižší akutní sérovou koncentraci měřených markerů (8-OHG:  $r = 0,480$ ,  $p = 0,011$ ; o-Tyr:  $r = 0,408$ ,  $p = 0,035$ ; NO-Tyr:  $r = 0,459$ ,  $p = 0,016$ ).

Z hlediska terapeutických opatření v době hospitalizace s akutní otravou metanolem nebyla zaznamenána asociace mezi akutní sérovou koncentrací měřených biomarkerů a typem antidota podávaným v nemocnici k inhibici alkohol dehydrogenázy a k zastavení metabolismu metanolu (etanol versus fomepizol). Nicméně, pacienti, kterým byl podán v prehospitální době etanol jako první pomoc, měli relativně vyšší akutní sérové koncentrace měřených biomarkerů (8-OHdG:  $r = 0,388$ ,  $p = 0,041$ ; 8-OHG:  $r = 0,504$ ,  $p = 0,006$ ; 5-OHMU:  $r = 0,379$ ,  $p = 0,047$ ).

**Tabulka 5** Markery oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřené u pacientů s akutní otravou metanolem během hospitalizace (Group I) a dva roky po propuštění z nemocnice (Group II) (průměr ± SD).

	<b>8-OHdG</b>	<b>8-OHG</b>	<b>5-OHMU</b>	<b>o-Tyr</b>	<b>NO-Tyr</b>	<b>Cl-Tyr</b>
	<b>[pg/mL]</b>	<b>[pg/mL]</b>	<b>[pg/mL]</b>	<b>[pg/mL]</b>	<b>[pg/mL]</b>	<b>[pg/mL]</b>
<b>Group I</b>	94,4±6,2	94,8±6,2	79,1±5,7	163±11	107,4±9,0	95±8,4
<b>Group II</b>	78±10	87,1±6,9	75,7±4,6	124±17	104,1±7,9	86,1±7,6
<b>P<sub>I/II</sub></b>	<b>0,009</b>	0,094	0,343	<b>0,000</b>	0,580	0,119
<b>Survived</b>	97,3±7,4	97,9±7,2	81,4±6,5	166±12	110,1±9,7	96,0±8,4
<b>Died</b>	50±23	83,7±6,7	83,3±9,9	150±28	97±29	91±33
<b>P<sub>Survived/Died</sub></b>	<b>0,000</b>	<b>0,047</b>	0,764	0,208	0,234	0,623
<b>No sequelae</b>	104,2±9,0	104,8±8,1	86,2±8,4	176±16	115±13	102±10
<b>Sequelae</b>	85,1±9,3	86±11	73,1±9,0	149±12	101±15	86±15
<b>P<sub>No Sequelae/Sequelae</sub></b>	<b>0,006</b>	<b>0,005</b>	<b>0,038</b>	<b>0,021</b>	0,159	0,055

Poznámky: 8-OHdG - 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHG - 8-hydroxyguanosine, 5-OHMU – hydroxymethyluracil, o-Tyr - ortho-tyrosine, NO-Tyr - nitrotyrosine, Cl-Tyr - chloro-tyrosine. Survived = Přeživší – pacienti ze skupiny Group I, kteří přežili otravu metanolem; Died = Zemřelí – pacienti ze skupiny Group I, kteří zemřeli v nemocnici; No sequelae = bez následků – pacienti ze skupiny Group I, kteří přežili bez zdravotních následků otravy; Sequelae = s následky – pacienti ze skupiny Group I, kteří přežili s dlouhodobými následky otravy metanolem; p <0,05 (tučná čísla) bylo považováno za signifikantní.

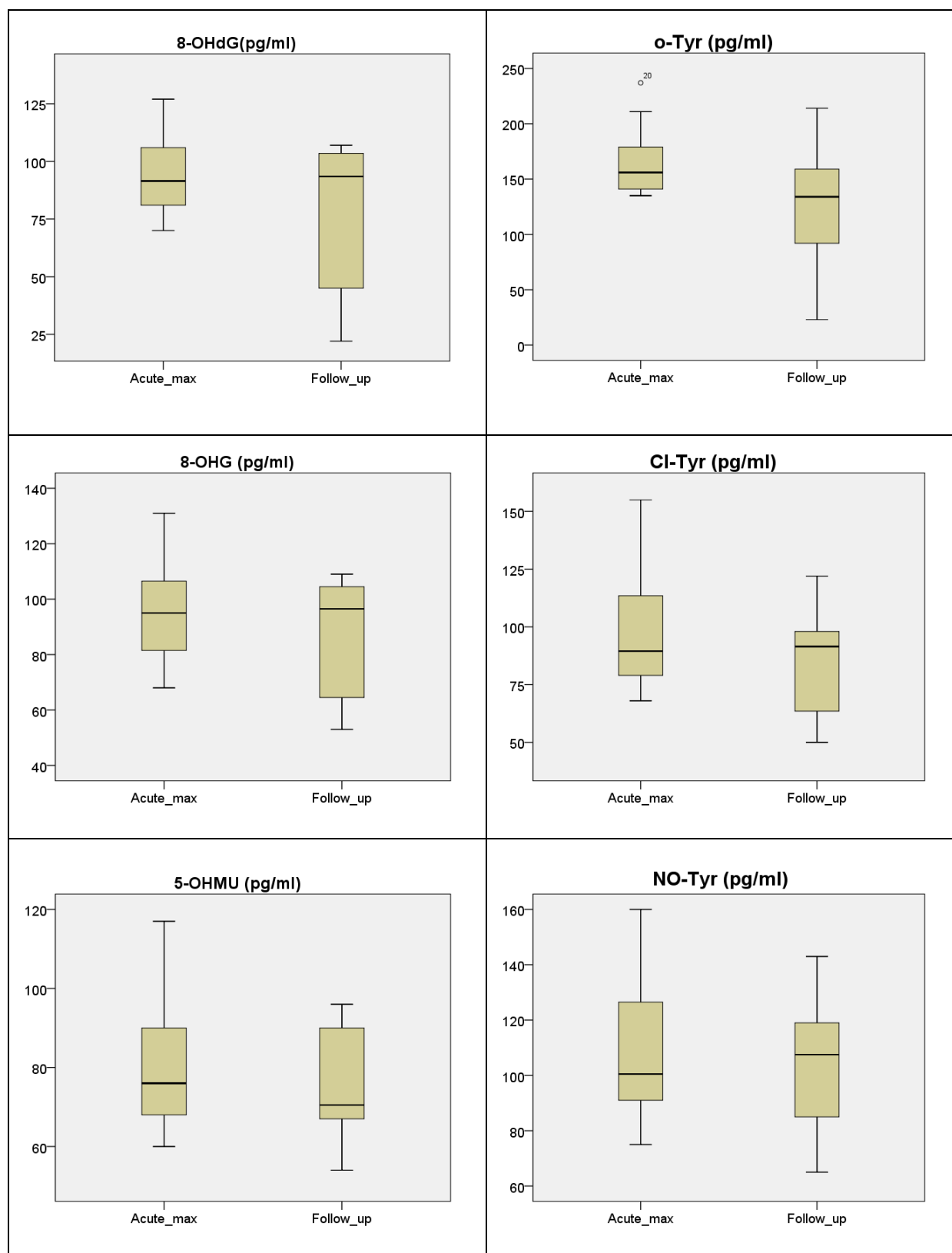


**Tabulka 6** Následné serové koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřené dva roky po propuštění z nemocnice u přeživších bez následků versus přeživších s dlouhodobými zraťovými a/nebo CNS následky metanolové otravy (means  $\pm$  CI95%).

Pacients	o-Tyr	NO-Tyr	Cl-Tyr	8-OHdG	8-OHG	5-OHMU
	[pg/mL]	[pg/mL]	[pg/mL]	[pg/mL]	[pg/mL]	[pg/mL]
No sequelae (N=17)	106 $\pm$ 29	100 $\pm$ 13	84 $\pm$ 11	79 $\pm$ 15	89 $\pm$ 10	75 $\pm$ 6
Sequelae (N=19)	130 $\pm$ 23	101 $\pm$ 15	85 $\pm$ 12	74 $\pm$ 15	85 $\pm$ 10	75,9 $\pm$ 7,5
P	0,110	0,849	0,865	0,594	0,497	0,911

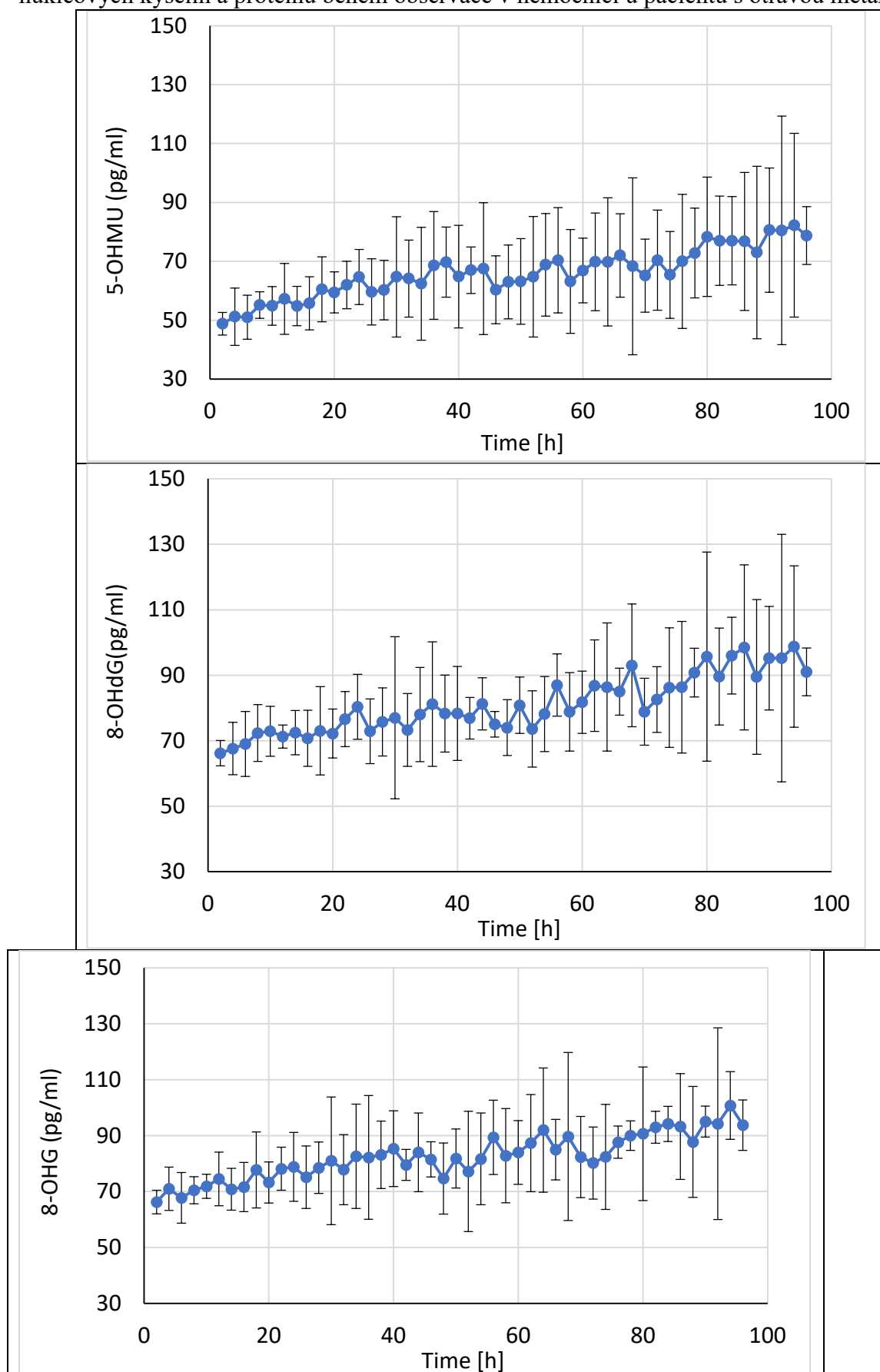
Poznámky: 8-OHdG - 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHG - 8-hydroxyguanosine, 5-OHMU – hydroxymethyluracil, o-Tyr - ortho-tyrosine, NO-Tyr - nitrotyrosine, Cl-Tyr - chloro-tyrosine. No sequelae = bez následků – pacienti, kteří přeřili bez zdravotních následků otravy; Sequelae = následky – pacienti, kteří přeřili otravu metanolem s dlouhodobými zraťovými nebo CNS následky; p <0,05 bylo považováno za signifikantní.

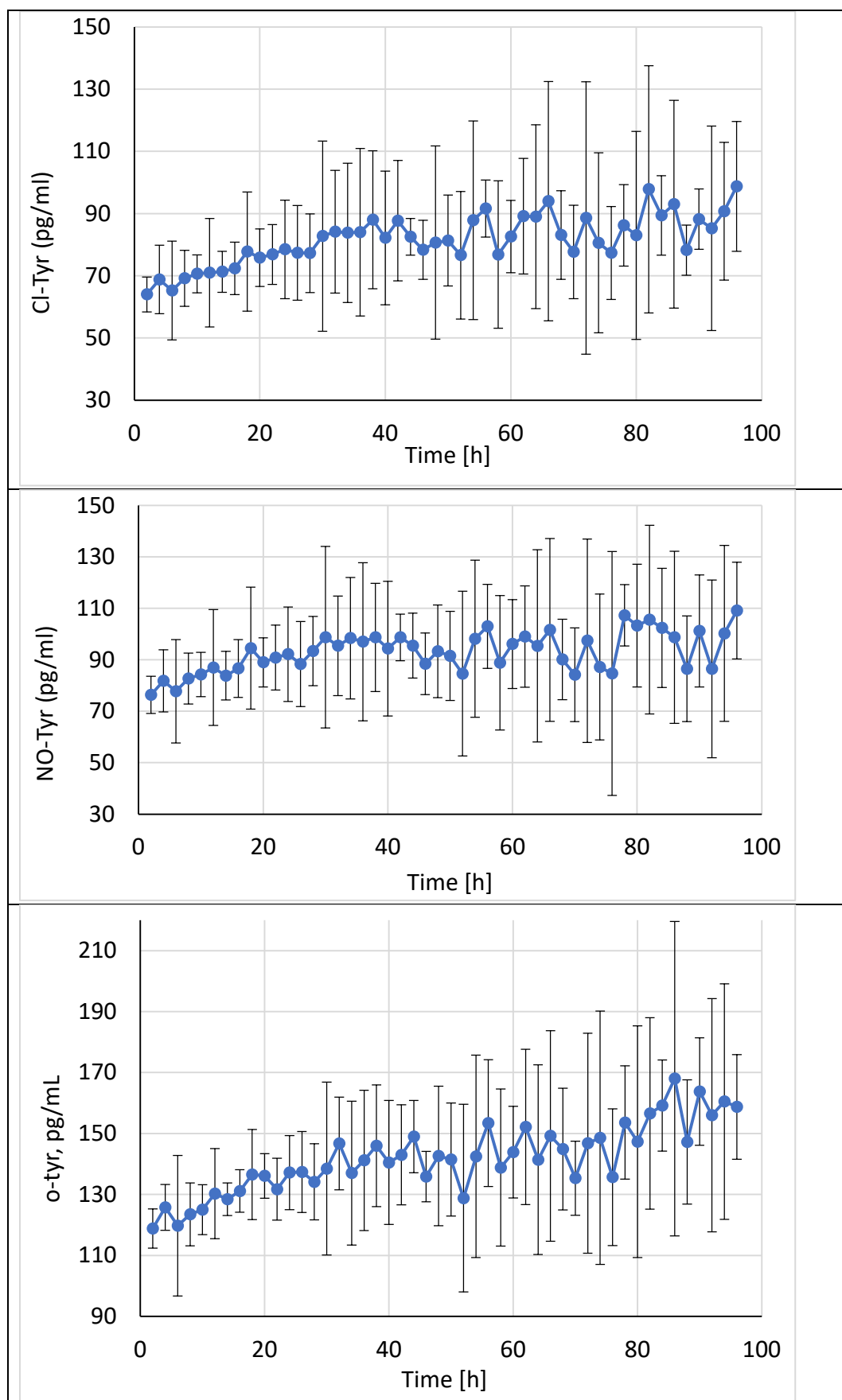
**Obrázek 14** Krabicové grafy sérových koncentrací markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřených za hospitalizace (Acute) a u přeživších dva roky po propuštění z nemocnice (Follow up).



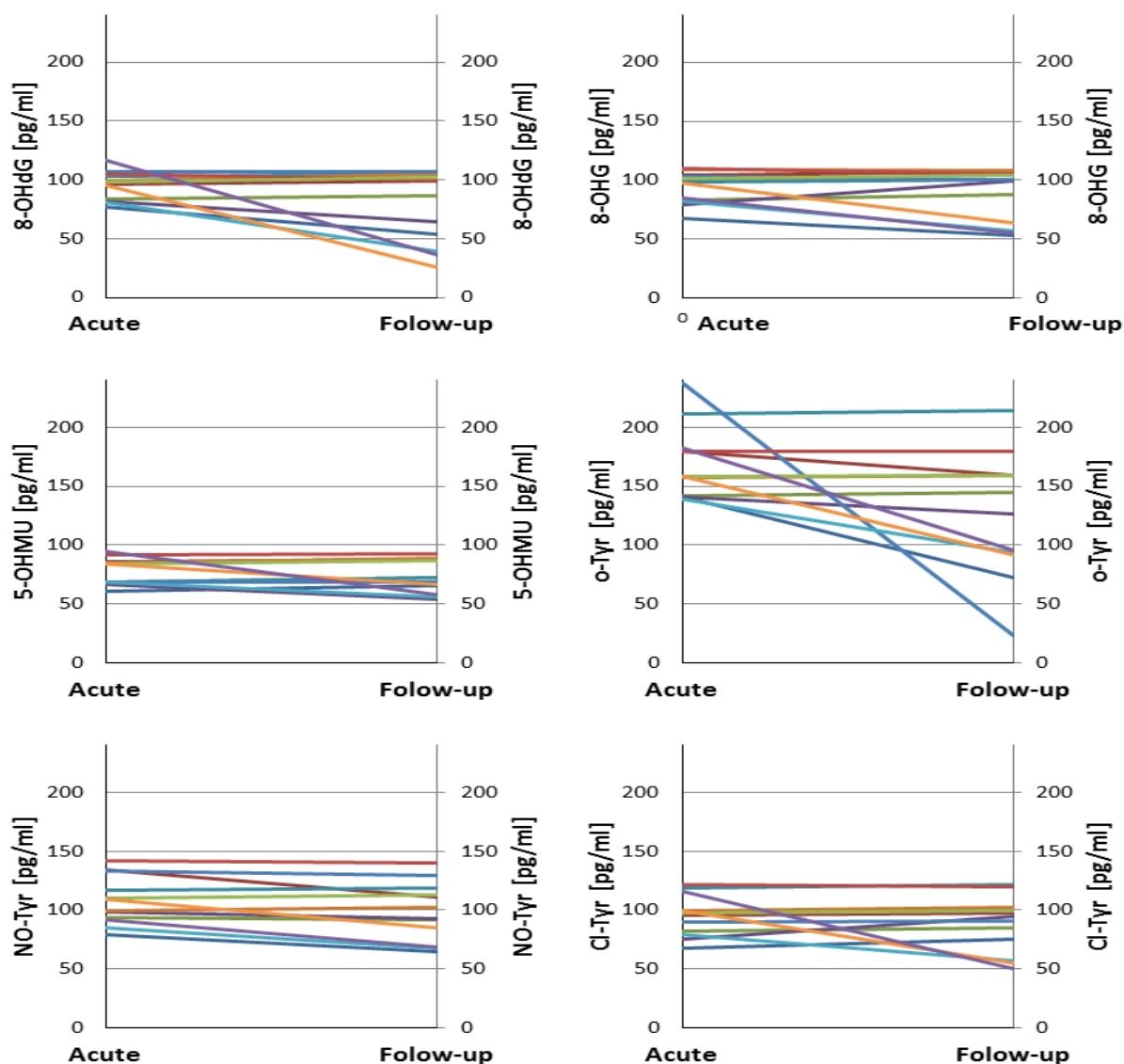
Poznámky: Acute Cmax – maximální sérové koncentrace měřené během hospitalizace. Standartní chyba průměru (SEM, box), 95% CI od průměru jsou prezentovány p < 0,001.

**Obrázek 15** Dynamika změn akutních sérových koncentrací markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů během observace v nemocnici u pacientů s otravou metanolem





**Obrázek 16** Změny sérových koncentrací markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřených během hospitalizace (“Acute”) versus koncentrace měřené dva roky po propuštění u stejných pacientů (“Follow-up”).



### 5.2.2 Následné (follow-up) koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů

Následné sérové koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů nekorelovaly s akutně měřenými koncentracemi. Nepozorovali jsme asociaci mezi následnými koncentracemi uvedených markerů a dlouhodobými následky otravy ze strany CNS u přeživších pacientů. U 12 jedinců, u kterých byly markery měřené jak za hospitalizace s akutní otravou, tak i dva roky po propuštění z nemocnice, byl pozorován významný pokles sérové koncentrace pouze u o-Tyr. Pokles v sérových koncentracích ostatních markerů nebyl

signifikantní. Pokles sérových koncentrací markerů oxidativního poškození je znázorněn na obrázku 16.

V naší studii jsme pozorovali pouze mírné poškození nukleových kyselin oxidačním stresem u akutní intoxikace metanolem. Pouze jeden ze tří akutních markerů, 8-OHdG, byl signifikantně zvýšen v porovnání s následnou koncentrací. Z experimentálních studií na zvířatech je známo, že 8-OHdG je nejsenzitivnější marker poškození mitochondriální DNA, který bývá zvýšen i u jiných otrav, v jejichž patofyziologii hraje roli dysfunkce mitochondriálního dýchacího řetězce [Chen et al., 2010].

Oxidativní stres je jedním z nespecifických protektivních mechanismů podílejících se na aktivaci mikroglie a astrocytů při akutním poškození mozkové tkáně. Proto produkty oxidace nukleových kyselin a bílkovin nejsou specifické jen pro otravu metanolem. Mohou být naměřeny i v jiných případech netraumatického poškození mozku. Studovali jsme asociaci mezi zvýšenou koncentrací markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů a závažností otravy, metabolické acidózy a určitými léčebnými postupy. O-Tyr byl jediným akutně elevovaným markerem proteinového poškození v naší studii. Akutní elevace měřených markerů byla pomalá, mírná, bez peaků během doby sledování. Přeživší pacienti měli relativně vyšší koncentrace markerů poškození nukleových kyselin 8-OHdG a 8-OHG, ale markery oxidace bílkovin elevovány nebyly. Konečně u pacientů, kteří přežili otravu bez následků, byly koncentrace všech markerů oxidace nukleových kyselin a o-Tyr relativně vyšší. Koncentrace markerů poškození nukleových kyselin a bílkovin měřené u stejných jedinců po dvou letech vykazovaly jenom mírný pokles nebo žádné změny.

Kyselina mravenčí je mitochondriální jed, který inhibuje cytochrom c oxidázu, což vede k histotoxické hypoxii, depleci adenosintriphosphátu a zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů [Erecinska M, 1980; Seme et al., 2001]. Tyto změny ovlivňují určité antioxidační systémy v centrální nervové soustavě – superoxid dismutázu, glutathion, glutathion peroxidázu, alfatokoferol a karnosin [Halliwell et al., 1999]. Mozek reaguje na poškození nespecifickou neurozánětlivou reakcí [Lagaraoui et al., 2012]. Reaktivní aldehydy, které vznikají při lipoperoxidaci lipidů při působení mírného oxidačního stresu aktivují astrocyty a buňky mikroglie. Tyto aktivované buňky potom produkují leukotrieny, mediátory zánětu [Faulkner et al., 2004].

Na druhé straně těžší oxidační stres může vést k poškození složitějších molekul – mitochondriální DNA, enzymů, strukturálních proteinů a aktivaci nukleárního transkripčního faktoru kappa B, který je hlavním regulátorem programované buněčné smrti [Fan et al., 2008]. Efekty těžkého oxidačního stresu jsou popsány například na studiích toxicity paraquat

[Onyon et al., 1987; Keeney et al., 06]. Paraquat je extrémně toxický herbicid, který může po akutní expozici způsobit smrt kvůli mitochondriální dysfunkci. Paraquat vyvolává těžký oxidační stres s dramatickým vzestupem produkce volných kyslíkových radikálů, což vede k závažnému poškození nukleových kyselin, proteinů a k indukci apoptózy [McCarthy et al., 2004]. V experimentálních studiích bylo popsáno signifikantní zvýšení koncentrace 8-OHdG v hippocampu otrávených paraquatem myší. Těžké oxidační poškození mitochondriální DNA zde bylo hlavní příčinou úmrtí neuronů v hippocampu [Chen et al., 2010].

Výsledky naší studie demonstrují, že nukleové kyseliny a bílkoviny jsou při akutní otravě metanolem oxidačním stresem zasaženy jen mírně. Osoby přeživší otravu měly ve srovnání s akutními koncentracemi jen nesignifikantní pokles v následných sérových koncentracích markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů. Toto znamená, že pro protektivní účinek oxidačního stresu musí jeho intenzita být dostatečná pro aktivaci astrocytů a buněk glie a pro indukci neurozánětlivé reakce. Zároveň však musí být mírný, aby nedošlo k poškození mitochondriální DNA nebo těžkým změnám v klíčových proteinech, které mohou vést k apoptóze a smrti.

Lipidy v membránách buněk jsou prvními strukturami, které jsou poškozeny oxidačním stresem [Halliwell et al., 2007]. Zjistili jsme, že mírný oxidační stres spouští peroxidaci lipidů a syntézu reaktivních aldehydů [Hlusicka et al., 2018]. Tato studie demonstruje, že oxidační stres je víceetapový proces a spektrum markerů závisí na intenzitě stresu. Peroxidace lipidů je spouštěna jako první již na začátku působení mírného stresu. Prohloubení oxidačního stresu, který ale stále může působit protektivně, je charakterizováno mírnou elevací některých markerů poškození DNA. Těžký oxidační stres způsobuje poškození proteinů, mění jejich strukturu a funkci. U pacientů s akutní intoxikací metanolem bylo poškození proteinů jen velmi mírné, což dokazuje, že pouze koncentrace jednoho markeru o-Tyr byla mírně elevována.

Intenzita oxidačního stresu je zásadní determinantou, toho, zda bude buněčná odpověď adaptivní či maladaptivní. Neuroinflamace je adaptivní reakcí mozkové tkáně na toxické poškození metabolity metanolu [Zakharov et al., 2017c]. Pro spouštění tohoto procesu je nezbytná aktivace neuroglie a astrocytů, která následně vede k syntéze mediátorů zánětu: cytokinů, interleukinů a leukotrienů. Neurozánětlivá reakce jako výsledek endogenní imunitní aktivity v mozku je univerzální odpověď CNS na poškození, která limituje poškozenou oblast, chrání neurony, podporuje zotavení tkáně a hojení.

Chronický oxidativní stres nebyl pozorován u pacientů přeživších akutní otravu metanolem. Dva roky po propuštění z nemocnice nebyla zaznamenána elevace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů ve sledovaném souboru. Při následném (follow up) měření uvedených markerů nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi jejich koncentracemi u pacientů přeživších otravu s následky a bez následků ze strany CNS. Následné koncentrace markerů nekorelovaly ani s akutními koncentracemi, ani s klinickými a laboratorními parametry měřenými ve sledovaném souboru.

### **5.3 MR-volumetrie jako biomarker prognózy u akutní otravy metanolem**

V rámci studie jsme analyzovali volumetrická data magnetické rezonance mozku od 16 pacientů s akutními koncentracemi markerů oxidačního stresu a neuroinflamace (Group I) a od 28 pacientů přeživších otravu s následnými markery měřenými dva roky po propuštění z nemocnice (Group II) (tabulka 7). Data z MR byla zpracována neurosoftwarem Morphobox za účelem výpočtu objemů jednotlivých mozkových struktur (tabulka 8 znázorňuje objemy struktur bazálních ganglií u pacientů s nekrózou a bez ní). Získaná data jsme porovnávali s klinicko-laboratorními daty a s výsledky měření tloušťky nervových vláken sítnice a evokovaných zrakových potenciálů v rámci prospektivní studie dlouhodobých následků akutních otrav metanolem.

Významná korelace byla přítomna v Group II mezi objemem putamen a pH arteriální krve při přijetí ( $r = 0,450$ ;  $p = 0,020$  pro levý putamen a  $r = 0,442$ ;  $p = 0,020$  pro pravý putamen). Negativní korelace byly přítomny mezi objemem putamen a dalšími laboratorními parametry závažnosti otravy: sérová koncentrace laktátu ( $r = -0,634$ ;  $p < 0,001$  pro levý putamen a  $r = -0,591$ ;  $p = 0,010$  pro pravý putamen), kreatininu ( $r = -0,526$ ;  $p = 0,010$  pro levý putamen a  $r = -0,472$ ;  $p = 0,010$  pro pravý putamen), a glukózy ( $r = -0,554$ ;  $p < 0,001$  pro levý putamen a  $r = -0,501$ ;  $p = 0,010$  pro pravý putamen). V Group I koreloval objem putamen s aniontovým oknem a sérovým kreatininem jako parametry závažnosti otravy. Pacienti s akutní lézí bazálních ganglií měli nižší hodnoty pH arteriální krve, vyšší base excès a aniontový gap, vyšší koncentrace laktátu, glykémie a sérový kreatinin při přijetí do nemocnice.



**Tabulka 7.** Demografická, biochemická a toxikologická data pro “akutní” skupinu (Group I,  $n = 16$ ) a pro skupinu “Follow-up” (Group II,  $n=28$ ); průměr se směrodatnou odchylkou.

Parameter	Age [years]	S-MetOH [mg/L]	S-EtOH [mg/L]	pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/L]	BD [mmol/L]	Anion gap [mmol/L]	S-Formate [mg/L]	Creatinine [μmol/L]	Lactate [mmol/L]	Glucose [mmol/L]
<b>Group I</b>	53.9±8.1	1400±540	320±300	7.13±0.14	11.1±4.2	-16.8±6.3	26.7±6.0	510±190	89±22	4.6±2.8	9.8±2.4
<b>Group II</b>	46.4±5.1	1240±400	330±200	7.16±0.09	10.8±2.9	-17.3±4.4	28.2±4.6	550±190	92±15	3.7±2.0	8.0±1.6
<b>p</b>	0.101	0.608	0.981	0.715	0.915	0.890	0.691	0.773	0.800	0.589	0.198

Poznámky: Věk = roky ; S–MetOH = sérový metanol při přijetí; S–EtOH = sérový etanol při přijetí; pH = pH arteriální krve při přijetí; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> = sérový bikarbonát při přijetí; BD = base deficit; AG = aniontový gap; Formic Acid = kyselina mravenčí při přijetí.

**Tabulka 8.** MR-volumetrie nucleus caudatus, putamen a globus pallidus u pacientů s nekrozou bazálních ganglií versus u pacientů bez nekrozy bazálních ganglií, “akutní” skupina (Group I,  $n = 16$ ) a “Follow-up” skupina (Group II,  $n=28$ ); průměry se směrodatnou odchylkou.

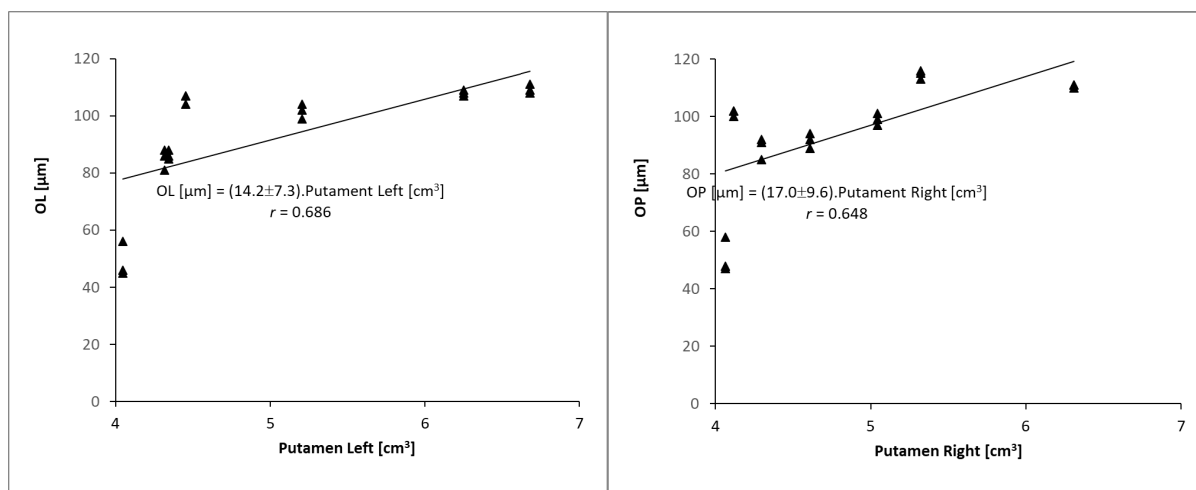
Region	Group I, BG necrosis	Group I, no necrosis	p	Group II, BG necrosis	Group II, no necrosis	p
<b>Nucleus caudate left [cm<sup>3</sup>]</b>	3,77±0,53	4,56±0,44	<b>0,038</b>	3,88±0,22	4,37±0,31	<b>0,013</b>
<b>Nucleus caudate right [cm<sup>3</sup>]</b>	4,08±0,51	4,88±0,45	<b>0,038</b>	4,17±0,23	4,80±0,39	<b>0,009</b>
<b>Putamen left [cm<sup>3</sup>]</b>	5,0±1,4	6,78±0,67	<b>0,011</b>	5,74±0,70	7,22±0,42	<b>0,000</b>
<b>Putamen right [cm<sup>3</sup>]</b>	4,8±1,2	6,22±0,59	<b>0,017</b>	5,42±0,59	6,58±0,39	<b>0,001</b>
<b>Globus pallidus left [cm<sup>3</sup>]</b>	1,52±0,28	1,87±0,27	0,102	1,61±0,13	2,01±0,15	<b>0,001</b>
<b>Globus pallidus right [cm<sup>3</sup>]</b>	1,64±0,36	1,86±0,21	0,246	1,71±0,15	2,02±0,13	<b>0,004</b>

Objem bazálních ganglií pozitivně koreloval s akutními koncentracemi určitých markerů oxidativního poškození (o-Thyr, 8-isoprostan aj.) a zánětu (leukotrien LTB4). Pacienti s větším objemem mozkových struktur měli relativně vyšší koncentrace těchto markerů (Tabulky 9, 10). Nebyla nalezena asociace mezi výsledkem měření zrakových evokovaných potenciálů a volumetrií bazálních ganglií. Nicméně byla pozorována signifikantní korelace objemu bazálních ganglií, zejména putamen, s tloušťkou nervových vláken sítnice (obrázek 17; tabulky 9, 10).

Mezi následnými (follow-up) koncentracemi markerů neurozánětu a hodnotami volumetrie nebyla nalezena korelace. Co se týče markerů oxidativního poškození, při následném měření v rámci prospektivní studie koncentrace o-Tyr negativně korelovala s objemem putamen, a to oboustranně. Všechny ostatní asociace nebyly signifikantní.

Statisticky významná korelace byla přítomna mezi výsledky MR-volumetrie mozku a výsledky měření tloušťky nervových vláken sítnice: čím větší byl objem putamen, tím tlustší vrstva nervových vláken sítnice (tabulka 9, 10).

**Obrázek 17** Korelace mezi objemem putamen a tloušťkou nervových vláken sítnice (OP – pravé oko; OL – levé oko)



**Tabulka 9.** Korelace volumetrie nucleus caudatus, putamen a globus pallidus s akutními sérovými koncentracemi markerů oxidačního stresu, zánětu a tloušťky nervových vláken sítnice (RNFL) měřených na OCT ve skupině Group I.

		Putamen		Caudate		Pallidum	
		Left	right	left	right	Left	right
<b>Markers of oxidative stress and inflammation</b>	o-Thyr	<b>0,58*</b>	<b>0,58*</b>	0,17	0,28	<b>0,64**</b>	<b>0,69**</b>
	8-isoprostan	<b>0,61*</b>	<b>0,59*</b>	0,16	0,27	<b>0,64**</b>	<b>0,68**</b>
	8-OHdG	0,47	0,41	0,05	0,15	<b>0,56*</b>	<b>0,52*</b>
	8-OHG	0,40	0,33	0,03	0,13	0,45	0,43
	5-OHMU	0,28	0,21	0,02	0,08	0,26	0,21
	MDA	0,33	0,31	0,19	0,27	0,40	<b>0,52*</b>
	HNE	0,34	0,31	0,11	0,22	0,35	0,47
	HHE	0,34	0,30	0,10	0,21	0,36	0,41
	NO-Tyr	0,41	0,39	0,27	0,34	0,43	<b>0,50*</b>
	Cl-Tyr	0,31	0,28	0,17	0,25	0,32	0,45
	LTC4	0,30	0,24	0,03	0,05	0,32	0,42
	LTD4	0,29	0,21	0,09	0,10	0,34	0,36
	LTE4	0,29	0,22	0,07	0,14	0,20	0,30
	LTB4	<b>0,61*</b>	<b>0,61*</b>	0,23	0,38	<b>0,69**</b>	<b>0,70**</b>
<b>RNFL</b>	OD global	<b>0,78**</b>	<b>0,72*</b>	0,44	0,36	<b>0,67*</b>	0,55
	OD nasal	<b>0,68*</b>	<b>0,68*</b>	0,31	0,31	<b>0,65*</b>	<b>0,63*</b>
	OD temporal	<b>0,69*</b>	0,62	0,58	0,48	0,52	0,41
	OS global	<b>0,76*</b>	<b>0,70*</b>	0,47	0,38	0,68	<b>0,51*</b>
	OS nasal	0,55	0,56	0,48	0,40	0,58	0,49
	OS temporal	<b>0,78**</b>	<b>0,73*</b>	<b>0,65*</b>	0,59	0,65	<b>0,53*</b>

Poznámky: OD – pravé oko; OS – levé oko

**Tabulka 10** Korelace volumetrie nucleus caudatus, putamen a globus pallidus s akutními sérovými koncentracemi markerů oxidačního stresu, zánětu a tloušťky nervových vláken sítnice (RNFL) měřených na OCT ve skupině Group II.

		Putamen		Caudatus		Pallidum	
		left	right	left	right	left	right
Markers of oxidative stress	o-Tyr	<b>-0,39*</b>	<b>-0,37*</b>	-0,29	-0,17	-0,36	-0,26
	8-isoprostan	0,14	0,15	0,14	0,01	0,14	0,07
	8-OHdG	-0,02	-0,01	-0,10	-0,10	-0,02	-0,10
	8-OHG	-0,16	-0,15	-0,18	-0,15	-0,16	-0,22
	5-OHMU	-0,24	-0,24	-0,26	-0,22	-0,25	-0,36
	MDA	0,27	0,22	0,14	0,04	0,29	0,14
	HNE	-0,04	-0,04	-0,14	-0,11	-0,06	-0,18
	HHE	0,03	-0,04	0,09	0,03	0,02	0,03
	NO-Tyr	-0,07	-0,11	-0,14	-0,14	-0,11	-0,21
	Cl-Tyr	-0,18	-0,19	-0,23	-0,23	-0,21	-0,28
RNFL	OD global	<b>0,47*</b>	<b>0,43*</b>	0,10	0,15	0,35	0,23
	OD nasal	<b>0,41*</b>	<b>0,41*</b>	0,16	0,24	0,27	0,19
	OD temporal	<b>0,41*</b>	<b>0,40*</b>	-0,01	0,12	0,29	0,30
	OS global	<b>0,43*</b>	<b>0,41*</b>	0,17	0,19	<b>0,40*</b>	0,30
	OS nasal	0,29	0,27	0,04	0,11	0,20	0,09
	OS temporal	<b>0,44*</b>	0,37	0,35	0,30	0,29	0,25

Poznámky: OD – pravé oko; OS – levé oko

MR-volumetrie mozku má dobrý potenciál stát se zobrazovacím biomarkerem charakteru a závažnosti CNS poškození po akutní otravě metanolem. Výsledky naší studie ukázaly, že pacienti s MR známkami toxického poškození mozku měli signifikantně menší objem bazálních ganglií, hlavně putamen, ale také nucleus caudatus a globus pallidus. Volumetrická data korelovala s akutními laboratorními parametry závažnosti metabolické acidozy – (pH arteriální krve, base excess, aniontové okno, laktát) a závažností otravy (sérový kreatinin a glukóza). Objem bazálních ganglií koreloval s určitými akutními koncentracemi markerů oxidativního poškození biomolekul a neurozánětu. Kromě o-Tyr již nebyla tato korelace nalezena při následném vyšetření dva roky po otravě. Naše studie prokázala významnou pozitivní korelaci mezi objemem bazálních ganglií a tloušťkou nervových vláken sítnice měřených po propuštění z nemocnice a v průběhu následných vyšetření.

U akutních intoxikací metanolem jsou známy určité prognostické faktory. Pacienti s vyšším pH arteriální krve, vyšší koncentrací bikarbonátu, nižším aniontovým oknem, sérovým laktátem a relativně vyššími koncentracemi markerů oxidativního poškození lipidů a leukotrienů, mají lepší prognózu. Naše data demonstrují pozitivní korelaci mezi objemem bazálních ganglií – hlavně putamen – a pH arteriální krve při příjmu. Objem bazálních ganglií byl tím menší, čím horší byly parametry metabolické acidózy a závažnosti akutní intoxikace.

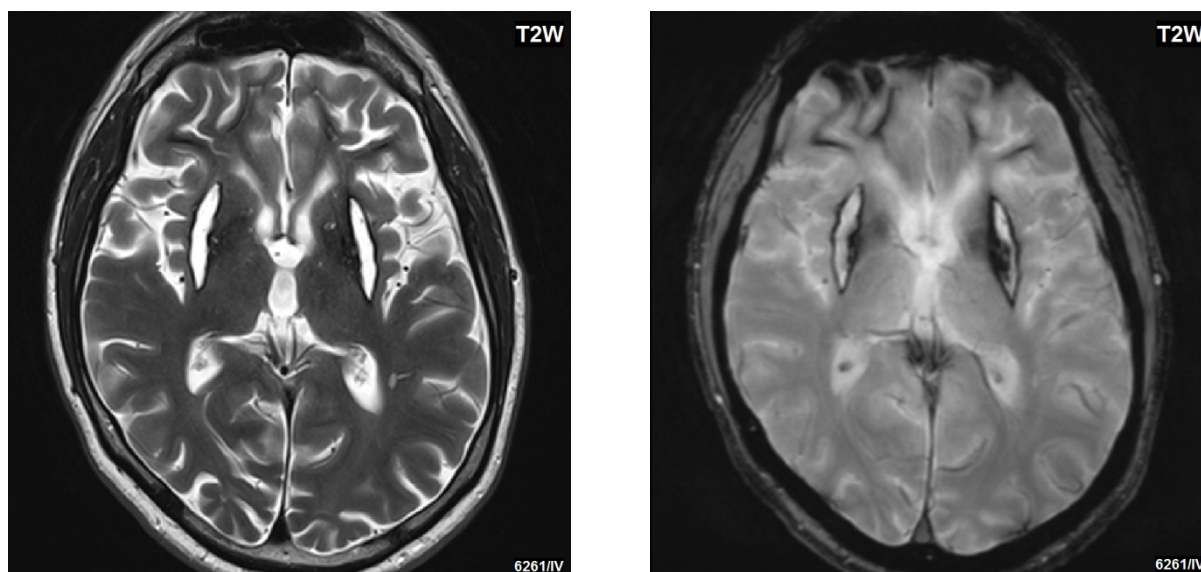
Byla pozorována pozitivní korelace mezi objemem bazálních ganglií a sérovými koncentracemi několika markerů oxidativního poškození biomolekul a neurozánětlivé reakce. Vyšší objem bazálních ganglií byl asociován s relativně vyššími koncentracemi MDA, 8-OHdG, o-Tyr a LTB<sub>4</sub>, což znovu naznačuje adaptivní roli oxidačního stresu u otrav metanolem. Při následném vyšetření tyto korelace již nebyly signifikantní. Pouze jeden marker – o-Tyr – negativně koreloval s objemem putamen, což naznačuje možný chronický proces v tomto případě. Chronický oxidativní stres může být asociován s neurodegenerací, jak již bylo předesláno v předchozích studiích [Ischiropoulos et al., 2003, Bhat et al., 2015].

U pacientů přeživších otravu metanolem je typickým nálezem na magnetické rezonanci bilaterální nekróza bazálních ganglií – hlavně putamen (obrázek 18) [Vaneckova et al., 2015]. Neurony bazálních ganglií, stejně jako neurony sítnice a jejich axony, jsou nejvíce náchylné poškození kvůli hypoxii a oxidačnímu stresu [Blanco et al., 2006]. V první fázi poškození reagují mozková tkáň a sítnice otokem poškozených oblastí. Později dochází ke glióze a vzniku postmalatických pseudocyst [Viola A., 2000]. Podobné změny na MR byly zaznamenány u některých neurodegenerativních onemocnění, na jejichž vzniku se podílí

dlouhodobý oxidační stres. Například atrofie putamen, nucleus caudatus, mozkového kmene a mozečku u pacientů s Parkinsonovým syndromem [Schulz et al., 2001; Fox et al., 2000].

U pacientů přeživších otravu metanolem je typickým nálezem abnormální tloušťka sítnice. Důvodem je přímé poškození gangliových buněk toxickými účinky kyseliny mravenčí. Po otravě často dochází k progresi chronické retinální neurodegenerace a k dalšímu poklesu počtu axonů [Nurieva et al., 2015]. Mezi výsledky vyšetření MR-volumetrie a VEP jsme nenalezli signifikantní asociaci. Jedním z vysvětlení může být, že pacienti s těžkým poškozením zrakové dráhy nebyli schopni podstoupit toto funkční vyšetření. Na druhou stranu, OCT měření RNFL jasně demonstrovalo pozitivní korelaci mezi tloušťkou RNFL a objemem bazálních ganglií. Toto zjištění činí z OCT s měřením RNFL jednoduchou, levnou a spolehlivou screeningovou metodou pro pacienty po akutní otravě metanolem, která může pomoci diagnostikovat poškození bazálních ganglií. To může být následně potvrzeno pomocí MRI.

**Obrázek 18** MR snímek mozku u pacienta s akutní otravou metanolem. Hemoragická nekróza putamen, bilaterální subkortikální léze ve frontální bílé hmotě



## 5.4 Prevence

Pro prevenci dlouhodobých následků u otrav metanolem ze strany CNS je zásadní brzké podání inhibitorů alkoholdehydrogenázy a zabránění přeměny metanolu na jeho toxické metabolity – formaldehyd a kyselinu mravenčí. Akumulace kyseliny mravenčí vede k metabolické acidóze, při změně vnitřního prostředí dochází k narušení fungování životně důležitých enzymatických systémů, což vede ke spuštění anaerobních procesů a produkci

laktátu, který nadále prohlubuje vzniklou metabolickou acidózu. Zásadní je postižení mitochondrií, konkrétně inhibice mitochondriálního enzymu cytochrom c oxidázy. Tento enzym je součástí životně důležitého dýchacího řetězce, během něhož vzniká adenosintrifosfát, který slouží jako energetický substrát pro činnost buněk. Inhibicí cytochrom c oxidázy dochází ke snížení syntézy adenosintrifosfátu.

V současné době se k inhibici alkoholdehydrogenázy používají dvě látky. První je fomepizol, který nyní v České republice není k dispozici. Druhou látkou je etanol, s jeho dostupností u nás problém není. Dle studie Zakharova et al. z roku 2015c byla klinická účinnost obou látek v podstatě stejná. Rozdíl mezi antidoty je jednak v ceně, fomepizol je mnohem dražší, a také ve vlastnostech. Fomepizol nezpůsobuje útlum vědomí a je tak možné podat ho lidem s poruchou vědomí a také dětem a gravidním ženám.

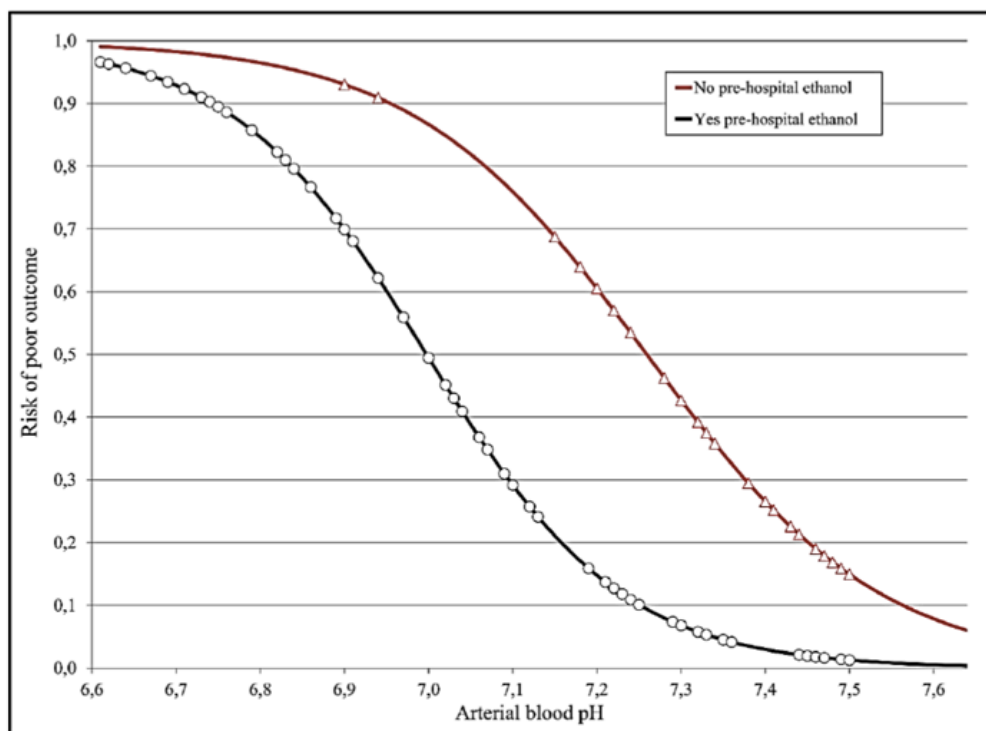
Jedna ze studií Zakharova et al. byla zaměřena na význam preventivního podávání etylalkoholu v přednemocničním období. Do studie bylo zařazeno 100 pacientů hospitalizovaných s akutní otravou metanolem. Jednalo se o 79 mužů a 21 žen, věkový medián byl 54 let. U všech jedinců byla změřena hladina etanolu v krvi při příjmu do nemocnice. 12/100 pacientů požílo alkohol v rámci první pomoci, u 30/100 pacientů byl alkohol podáván zdravotnickým personálem v rámci přednemocniční péče, konečně 58/100 pacientů nepožílo žádný alkohol před hospitalizací v nemocnici.

Pacienti s pozitivní koncentrací etanolu v krvi při přijetí do nemocnice měli na rozdíl od osob, které při přijetí neměli etanol v krvi, vyšší hodnoty pH arteriální krve, vyšší koncentraci bikarbonátu, mírnější metabolickou acidosu, nižší hodnoty aniontového okna, menší koncentrace laktátu a kyseliny mravenčí. Etanol podaný v rámci první pomoci dostatečně zablokoval alkoholdehydrogenázu, přitom i přes podání etanolu byli pacienti schopni hyperventilace. Etanol podaný v rámci první pomoci neměl vliv na regulační mechanismy acidobazické rovnováhy [McMartin 1980; Hovda et al., 2005c; Zakharov et al., 2015a,b,c].

V rámci naší studie bylo zjištěno, že u osob přeživších otravu metanolem byly stanoveny vyšší sérové koncentrace leukotrienů než u zemřelých; u přeživších otravu bez následků ze strany CNS byly stanoveny vyšší koncentrace leukotrienů než u pacientů přeživších otravu s dlouhodobými následky. Pacienti, kterým byl v rámci přednemocniční první pomoci podán etanol jako antidotum, měli relativně vyšší sérové koncentrace leukotrienu LTC<sub>4</sub> než ti, kteří etanol nedostali ( $r = 0,509$ ,  $p < 0,01$ ). Pozitivní sérová koncentrace etanolu při příjmu byla asociována s vyššími akutními koncentracemi LTC<sub>4</sub> ( $r = 0,404$ ,  $p < 0,05$ ). Stejná situace byla

s koncentrací MDA ( $r=0,382$ ,  $p=0,45$ ) a dalších markerů oxidačního stresu (8-OHdG:  $r = 0,388$ ,  $p = 0,041$ ; 8-OHG:  $r = 0,504$ ,  $p = 0,006$ ; 5-OHMU:  $r = 0,379$ ,  $p = 0,047$ ).

**Obrázek 19** Riziko špatné prognózy otravy metanolem v závislosti na podání etanolu před přijetím pacienta do zdravotnického zařízení.



Výsledky naší studie potvrzují, že podání etanolu v rámci přednemocniční péče je jednoznačně spojeno s lepší prognózou. Studie Zacharova et al. (2015c) doporučuje při suspektním požití metanolu jako první pomoc před příjmem do zdravotnického zařízení etanol v dávce 1,8-2,0 mL/kg váhy 40% alkoholu, pokud je pacient při vědomí. Optimální je udržet sérovou hladinu alkoholu mezi 1-1,5 promile. Tato první pomoc představuje důležité preventivní opatření, které vede k redukci výskytu dlouhodobých následků otrav metanolem ze strany CNS a zraku.

Výsledky naší studie MR-volumetrie poskytují další poznatky, které mohou mít přínos pro prevenci dlouhodobých následků otravy metanolem. Zjistili jsme, že OCT vyšetření sítnice s měřením tloušťky vrstvy nervových vláken (RNFL) lze použít jako screeningovou metodu pro indikaci k dražšímu a složitějšímu vyšetření magnetickou rezonancí – bude-li při OCT zjištěn úbytek buněk na sítnici (redukce v tloušťce sítnice), bude s největší pravděpodobností zmenšen objem bazálních ganglií a bude na místě provést vyšetření magnetickou rezonancí k potvrzení diagnózy.



## 6. ZÁVĚR

Pro účely studie jsme použili laboratorní a klinická data, která byla nasbírána v roce 2012 během hromadné intoxikace metanolem v České republice a následně v rámci prospektivní longitudinální kohortové studie „Role oxidačního stresu u akutních intoxikací metanolem“, která proběhla v letech 2013–2018 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze.

Souhrn výsledků a závěrů studie je uveden v následujících bodech:

### 6.1 Role neuroinflamace v mechanismech toxického poškození mozku u akutních otrav metanolem

Leukotrieny zprostředkovaná neurozánětlivá reakce hraje důležitou roli v mechanismech toxického poškození mozku u akutních otrav metanolem. U pacientů, kteří přežili otravu metanolem, je incidence akutního netraumatického poškození mozku vyšší než 50%. Nejčastějšími nálezy na MR jsou multifokální hemoragické léze s bilaterálním postižením putamen. Přítomnost tohoto nálezu je spojena s nižší akutní sérovou koncentrací leukotrienů v prvních hodinách až dnech hospitalizace; tato skutečnost demonstruje neuroprotektivní úlohu elevace koncentrace leukotrienů v mechanismech toxického poškození mozku metanolem. Mechanismy a dynamika neurozánětlivých změn v netraumatickém poškození mozku neurotoxickými látkami se liší od traumatického poranění mozku; elevace koncentrací leukotrienů je postupná a přechodná, případy chronické neuroinflamace ve sledovaném souboru nebyly zaznamenány. Signifikantní asociace mezi akutní sérovou koncentrací leukotrienů a prognózou svědčí o neuroprotektivní roli mírného zvýšení koncentrace leukotrienů, které bylo pozorováno u pacientů s akutní otravou metanolem.

### 6.2 Role lipoperoxidace u akutních otrav metanolem

Interakce mezi peroxidací membránových lipidů a neurozánětlivou reakcí má klíčovou roli v mechanismech toxického poškození mozku u akutních otrav metanolem. Akutní sérové koncentrace markerů lipoperoxidace a leukotrienů pozitivně korelovaly, byly signifikantně vyšší u hospitalizovaných pacientů než následné hodnoty a demonstrovaly postupný vzestup první 3-4 dny po příjmu do nemocnice. Pacienti s lepší prognózou měli relativně vyšší koncentrace měřených markerů lipoperoxidace, což může mít souvislost s adaptační rolí oxidačního stresu mírné intenzity.

Neuroinflamace a lipoperoxidace jsou provázané děje. Při působení oxidačního stresu dochází nejdříve k poškození lipidů v buněčných membránách. Dochází k lipoperoxidaci a k tvorbě a uvolňování biologicky aktivních reaktivních aldehydů – HHE, HNE, MDA. Za vhodných podmínek a při mírné intenzitě působícího oxidačního stresu jsou tyto aldehydy schopny aktivovat buňky neuroglie a astrocyty v CNS, což spouští leukotrieny zprostředkovanou neurozánětlivou reakci.

### **6.3 Karbonylový stres u akutních otrav metanolem**

Při akutní intoxikaci methanolem je karbonylový stres způsoben nadprodukcí reaktivních karbonylových aldehydů C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> a je také zapojen do mechanismů toxického poškození mozku vyvolaného intoxikací metanolem. Jedinci s akutní intoxikací měli signifikantně vyšší hladiny reaktivních aldehydů v krevním séru ve srovnání s hladinami měřenými o dva roky později. Snížení koncentrace reaktivních karbonylových sloučenin během sledovaného období ukázalo, že karbonylový stres byl přechodný a nebyl následován chronickým procesem.

### **6.4 Oxidativní poškození nukleových kyselin a proteinů u akutních otrav metanolem**

Oxidativní poškození nukleových kyselin a proteinů ve sledovaném akutním souboru mělo mírný charakter: pouze jeden ze tří měřených markerů poškození nukleových kyselin, 8-OHdG, a jeden ze sledovaných markerů oxidativního poškození proteinů, o-Tyr, byly signifikantně elevovány ve srovnání s následnými sérovými koncentracemi. Následné sérové koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů nekorelovaly s akutně měřenými koncentracemi.

### **6.5 MR volumetrie jako biomarker prognózy akutních intoxikací metanolem**

Pacienti se známkami toxického poškození mozku na magnetické rezonanci měli signifikantně menší objem bazálních ganglií, přičemž volumetrická data korelovala s akutními laboratorními parametry závažnosti metabolické acidózy (pH arteriální krve, base excess, anion gap, laktát) a závažností otravy (sérový kreatinin a glukóza). Objem bazálních

ganglií koreloval s akutními koncentracemi leukotrienů a markerů oxidativního poškození lipidů.

Byla pozorována pozitivní korelace mezi objemem bazálních ganglií a tloušťkou nervových vláken sítnice měřených po propuštění z nemocnice a v průběhu následných vyšetření. OCT vyšetření lze tedy použít jako jednoduchou, rychlou a levnou screeningovou metodu pro indikaci k magnetické rezonanci mozku – bude-li při OCT zjištěn úbytek gangliových buněk na sítnici (redukce v tloušťce vrstvy nervových vláken sítnice), bude s největší pravděpodobností i zmenšený objem struktur bazálních ganglií a bude na místě provést vyšetření magnetickou rezonancí k ozřejmění této hypotézy.

## **6.6 Prevence dlouhodobých následků otrav metanolem**

Naše studie potvrzuje, že pro prevenci dlouhodobých následků otrav metanolem je klíčové včasné podání antidota – inhibitoru alkoholdehydrogenázy. Stěžejní je podání inhibitorů ADH již před příjmem do zdravotnického zařízení, v rámci přednemocniční první pomoci. Osoby s pozitivní hladinou alkoholu v séru při příjmu do zdravotnického zařízení měli vyšší hodnoty pH krve, menší koncentraci kyseliny mravenčí a celkově lepší prognózu. Alkohol by měl být podán co nejdříve po požití metanolu. V žádném případě by se s podáním etanolu nemělo čekat na výsledky toxikologického vyšetření.

Dalším poznatkem ze studie preventivního zaměření je, že OCT vyšetření sítnice s měřením tloušťky vrstvy nervových vláken (RNFL) lze použít jako screeningovou metodu pro včasné odhalení dlouhodobých následků otravy ze strany CNS a indikaci k dražšímu a složitějšímu vyšetření mozku magnetickou rezonancí. Abnormální nález tloušťky vrstvy nervových vláken sítnice na OCT s největší pravděpodobností svědčí o poškození bazálních ganglií a nutnosti neurologického sledování zdravotního stavu po ověření nálezu pomocí MR mozku.

## 7. LITERATURA

1. Ahmad K. Methanol-laced moonshine kills 140 in Kenya. *The Lancet*. 2000; 356(9245): 1911-1911.
2. Barceloux DG., Randall Bond G., Krenzelok EP., Cooper H., Allister Vale J. American Academy of Clinical toxicology Ad Hoc Committee on the treatment Guidelines for methanol Poisoning, American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2002; 40(4):415-46.
3. Aruoma OI. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radical Research*. 1999; 30(6):419-27.
4. Barkhoudarian G., Hovda DA., Giza CC. The molecular pathophysiology of concussive brain injury. *Clinics in Sports Medicine*. 2011; 30(1):33-48.
5. Bell KF., Al-Mubarak B., Fowler JH., Baxter PS., Gupta K., Tsujita T., Chowdhry S., Patani R., Chandran S., Horsburgh K., Hayes JD. Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(1):E1-2.
6. Bennett IL., Cary FH., Mitchel GL., Cooper MN. Acute methyl alcohol poisoning: a review based on experiences in an outbreak of 323 cases. *Medicine*. 1953; 32(4):431-63.
7. Bhat A.H., Dar K.B., Anees S., Zargar M.A., Masood A., Sofi M.A., Ganie S.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015; 74:101-110.
8. Bindler F., Voges E., Laugel P. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. *Food Additives & Contaminants*. 1988; 5(3):343-51.
9. Birben E., Sahiner UM., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012; 5(1):9.
10. Blanco M., Casado R., Vázquez F., Pumar JM. CT and MR imaging findings in methanol intoxication. *Am J Neuroradiol*, 2006; 27(2): 452-454.
11. Blood A., Corser-Jensen C., Heidenreich K. Prolonged neuroinflammation following a single closed head injury (chi) in mice. *Journal of Investigative Medicine* 2015; 63(1):124-125.
12. Boyle R. *The Sceptical Chymist*. London, England: J. Cadwell, 1661; 192-195.
13. Bush TG., Puvanachandra N., Horner CH., Polito A., Ostensfeld T., Svendsen CN., Mucke L., Johnson MH., Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999; 23(2):297-308.
14. Cadet JL., Brannock C. Invited Review Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry International*. 1998; 32(2):117-31.
15. Calabrese V., Butterfield DA., Scapagnini G., Stella AG., Maines MD. Redox regulation of heat shock protein expression by signaling involving nitric oxide and carbon monoxide: relevance to brain aging, neurodegenerative disorders, and longevity. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006; 8(3-4):444-77.
16. Calabrese V., Colombrita C., Sultana R., Scapagnini G., Calvani M., Butterfield DA., Stella AG. Redox modulation of heat shock protein expression by acetylcarnitine in aging brain: relationship to antioxidant status and mitochondrial function. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006; 8(3-4):404-16.
17. Carini M., Aldini G., Facino RM. Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews*. 2004; 23(4):281-305.

18. Caro AA., Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annual Review in Pharmacol. Toxicology*. 2004; 44:27-42.
19. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2009; 157(1):1-11.
20. Cavalcante AG., Bruin PF. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2009; 35(12):1227-37.
21. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clinics in Liver Disease*. 2012; 16(4):667-85.
22. Ciccarelli R., D'Alimonte I., Santavenere C., D'Auro M., Ballerini P., Nargi E., Buccella S., Nicosia-Folco S.G., Caciagli F., Di Iorio P. Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway. *European Journal of Neuroscience*. 2004; 20(6), 1514-1524.
23. Ciceri P., Rabuffetti M., Monopoli A., Nicosia S. Production of leukotrienes in a model of focal cerebral ischaemia in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 2001; 133(8):1323-9.
24. Corser-Jensen CE., Goodell DJ., Freund RK., Serbedzija P., Murphy RC., Farias SE., Dell'Acqua ML., Frey LC., Serkova N., Heidenreich KA. Blocking leukotriene synthesis attenuates the pathophysiology of traumatic brain injury and associated cognitive deficits. *Experimental Neurology*. 2014; 256:7-16.
25. Cutler RG. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. *Rejuvenation Research*. 2005; 8(3):138-40.
26. da Fonseca A.C.C., Matias D., Garcia C., Amaral R., Geraldo L.H., Freitas, C., Lima F.R.S., 2014. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014; 8:362.
27. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(4):601-23.
28. Deng XS., Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Current Drug Abuse Reviews*. 2008;1(1):3-8.
29. Deniz AA., Laurence TA., Beligere GS., Dahan M., Martin AB., Chemla DS., Dawson PE., Schultz PG., Weiss S. Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(10):5179-84.
30. Desai T., Sudhalkar A., Vyas U., Khamar B. Methanol poisoning: predictors of visual outcomes. *JAMA Ophthalmology*. 2013; 131(3):358-64.
31. Dilip MN., Sankalia DM., Saraiya SP. Acute methyl alcohol poisoning “the blind drunk” – a review. *GJRA*. 2013; 2(6): 28-29.
32. Dorokhov YL., Shindyapina AV., Sheshukova EV., Komarova TV. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiological Reviews*. 2015; 95(2):603-44.
33. Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical Science*. 2003; 104(1):27-38.
34. Erecińska M., Silver IA. ATP and brain function. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1989; 9(1):2-19.
35. Erecińska M., Wilson DF. Inhibitors of cytochrome c oxidase. *Pharmacology & Therapeutics*. 1980; 8(1):1-20.
36. Esterbauer H., Schaur RJ., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1991; 11(1):81-128.

37. Evans MD., Dizdaroglu M., Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2004; 567(1):1-61.
38. Farias S., Frey LC., Murphy RC., Heidenreich KA. Injury-related production of cysteinyl leukotrienes contributes to brain damage following experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. 2009; 26(11):1977-86.
39. Farias SE., Zarini S., Precht T., Murphy RC., Heidenreich KA. Transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes in rat neuronal and glial cells. *Journal of Neurochemistry*. 2007;103(4):1310-8.
40. Faulkner J.R., Herrmann J.E., Woo M.J., Tansey K.E., Doan N.B., Sofroniew M.V.. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. 2004; 24(9), 2143-2155.
41. Fiedler E., Grossmann G., Kersebohm DB., Weiss G., Witte C. Methanol. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 2000.
42. Finkel T., Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809):239.
43. Fleisher A.S., Sun S., Taylor C., Ward C.P., Gamst A.C., Petersen R.C., Jack C.R., Aisen P.S.; Thal L.J. Volumetric MRI vs clinical predictors of Alzheimer disease in mild cognitive impairment. *Neurology*. 2008; 70(3):191-199.
44. Fox N.C., Jenkins R., Leary S.M., Stevenson V.L., Losseff N.A., Crum W.R., Harvey R.J., Rossor M.N., Miller D.H., Thompson A.J. Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. *Neurology*. 2000; 54(4):807-812.
45. Giovanetti F. Methanol poisoning among travellers to Indonesia. *Travel Medicine of Infection Diseases*, 2013; 11(3):190-193.
46. Giudicissi Filho M., Holanda CV., Nader NA., Gomes SR., Bertolucci PH. Bilateral putaminal hemorrhage related to methanol poisoning: a complication of hemodialysis? Case report. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 1995; 53(3A):485-7.
47. Greizerstein HB. Congener contents of alcoholic beverages. *Journal of Studies on Alcohol*. 1981; 42(11):1030-7.
48. Gutteridge JM. Iron and oxygen radicals in brain. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1992; 32(S1):S16-21.
49. Halliwell B. Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease. *Encyclopedia of Life Science*. 2001.
50. Halliwell B., Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA; 2015.
51. Halliwell B., Halliwell B., Halliwell B., Gutteridge JM. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2006;7(sup1):67-.
52. Halliwell B. Antioxidant defenses. *Free radicals in biology and in medicine*. 1999.
53. Halliwell B. *Biochemistry of oxidative stress*. 2007
54. Halliwell B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurologica Scandinavica*. 1989; 80:23-33.
55. Hassanian-Moghaddam H., Nikfarjam A., Mirafzal A., Saberinia A., Nasehi AA., Masoumi Asl H., Memaryan N. Methanol mass poisoning in Iran: role of case finding in outbreak management. *Journal of Public Health*. 2014; 37(2):354-9.
56. Hawkins ME. Fluorescent pteridine probes for nucleic acid analysis. *Methods in Enzymology*. 2008; 450:201-31.

57. Hayyan M., Hashim MA., AlNashef IM. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical Reviews*. 2016; 116(5):3029-85.
58. Hernández MÁ., Holanda MS., Tejerina EE., González C., López M., Hernandez JL. Methanol poisoning and heparin: A dangerous couple? *The American Journal of Emergency Medicine*. 22(7):620-1.
59. Hovda KE., Hunderi OH., Tafjord AB., Dunlop O., Rudberg N., Jacobsen D. Methanol outbreak in Norway 2002–2004: epidemiology, clinical features and prognostic signs. *Journal of Internal Medicine*. 2005; 258(2):181-90.
60. Hovda KE., Urdal P., Jacobsen D. Increased serum formate in the diagnosis of methanol poisoning. *Journal of Analytical Toxicology*. 2005; 29(6):586-8.
61. Hubacek JA., Pelclova D., Seidl Z., Vaneckova M., Klempir J., Ruzicka E., Ridzon P., Urban P., Fenclova Z., Petrik V., Diblik P. Rare Alleles within the CYP 2E1 (MEOS System) Could be Associated with Better Short-Term Health Outcome after Acute Methanol Poisoning. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2015; 116(2):168-72.
62. Chen Q., Niu Y., Zhang R., Guo H., Gao Y., Li Y., Liu R. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: involvement of oxidative stress. *Neurotoxicology*. 2010; 31(3): 310-316.
63. Chowdhury FR., Bari MS., Alam J. Epidemiological profile of methanol poisoning in Bangladesh (2008-2014) and clinical experience of a single outbreak. *Asia Pacific Journal of Medical Toxicology*. 2014; 3(1):6.
64. Ischiropoulos. H., Beckman J.S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *The Journal of Clinical Investigation*. 2003; 111(2):163-169.
65. Jacobsen D., McMartin KE. Methanol and ethylene glycol poisonings. *Medical Toxicology*. 1986; 1(5):309-34.
66. Jiang Q., Zhang RL., Zhang ZG., Knight RA., Ewing JR., Ding G., Lu M., Arniego P., Zhang L., Hu J., Li Q. Magnetic resonance imaging characterization of hemorrhagic transformation of embolic stroke in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2002; 22(5):559-68.
67. Johlin FC., Fortman CS., Nghiem DD., Tephly TR. Studies on the role of folic-acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. *Molecular Pharmacology*. 1987; 31(5): 557-561.
68. Johnson VE., Stewart W., Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*. 2013; 246:35-43.
69. Kalincik T., Vaneckova M., Tyblova M., Krasensky J., Seidl Z., Havrdova E., Horakova D. Volumetric MRI markers and predictors of disease activity in early multiple sclerosis: a longitudinal cohort study. *PloS One*. 2012; 7(11):e50101.
70. Karayel F., Turan AA., Sav A., Pakis I., Akyildiz EU., Ersoy G. Methanol intoxication: pathological changes of central nervous system (17 cases). *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 2010; 31(1):34-6.
71. Karve IP., Taylor JM., Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology*. 2016; 173(4):692-702.
72. Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occupational and Environmental Medicine*. 2003; 60(8):612-6.
73. Kempuraj D., Thangavel R., Natteru PA., Selvakumar GP., Saeed D., Zahoor H., Zaheer S., Iyer SS., Zaheer A. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine*. 2016;1(1).
74. Kimmerer TW., MacDonald RC. Acetaldehyde and ethanol biosynthesis in leaves of plants. *Plant Physiology*. 1987; 84(4):1204-9.

75. Klistorner A., Arvind H., Garrick R., Yiannikas C., Paine M., Graham SL. Remyelination of optic nerve lesions: spatial and temporal factors. *Multiple Sclerosis Journal*. 2010; 16(7):786-95.
76. Kochanek PM., Berger RP., Bayr H., Wagner AK., Jenkins LW., Clark RS. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Current opinion in critical care*, 2008; 14(2):135-141.
77. Kramer PJ., Caldwell J., Hofmann A., Tempel P., Weisse G. Neurotoxicity risk assessment of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) as a synthetic impurity of drugs. *Human & Experimental Toxicology*. 1998; 17(5):283-93.
78. Kunz T., Marklund N., Hillered L., Oliw EH. Cyclooxygenase-2, prostaglandin synthases, and prostaglandin H2 metabolism in traumatic brain injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*. 2002; 19(9):1051-64.
79. Lagraoui M., Latoche JR., Cartwright NG., Sukumar G., Dalgard CL., Schaefer BC. Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. *Frontiers in Neurology*. 2012; 3:155.
80. Li SY., Li Q., Shen JJ., Dong F., Sigmon VK., Liu Y., Ren J. Attenuation of acetaldehyde-induced cell injury by overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene in human cardiac myocytes: role of MAP kinase signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2006; 40(2):283-94.
81. Liesivuori J., Savolainen AH. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. *Pharmacology & Toxicology*. 1991; 69(3):157-63.
82. Lin MT., Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006; 443(7113):787.
83. Lock EA., Zhang J., Checkoway H. Solvents and Parkinson disease: a systematic review of toxicological and epidemiological evidence. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013; 266(3):345-55.
84. Loft S., Poulsen HE. Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage. *Methods in Enzymology*. 1999; 300:166-184.
85. Lovinger DM., White G., Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*. 1989; 243(4899):1721-4.
86. Mark RJ., Lovell MA., Markesbery WR., Uchida K., Mattson MP. A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid  $\beta$ -peptide. *Journal of Neurochemistry*. 1997; 68(1):255-64.
87. Massey KA., Nicolaou A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. *Biochemical Society Transactions*. 2011; 39(5):1240-6.
88. Massoumi G., Saberi K., Eizadi-Mood N., Shamsi M., Alavi M., Morteza A. Methanol poisoning in Iran, from 2000 to 2009. *Drug and Chemical Toxicology*. 2012; 35(3), 330-333.
89. Mayer CL., Huber BR., Peskind E. Traumatic brain injury, neuroinflammation, and post-traumatic headaches. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2013; 53(9):1523-30.
90. McCarthy S., Somayajulu M., Sikorska M., Borowy-Borowski H., Pandey S. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004; 201(1):21-31.
91. McMartin KE., Makar AB., Martin GA., Palese M., Tephly TR. Methanol poisoning I. The role of formic acid in the development of metabolic acidosis in the monkey and the reversal by 4-methylpyrazole. *Biochemical Medicine*. 1975;13(4):319-33.



92. Mohan D., Chopra A., Ray R., Sethi H. India. In: Surveys of drinking patterns and problems in seven developing countries (Demers A, Room R, Bourguault C, Eds.); *World Health Organization*, Geneva. 2001, 103-114.
93. Moore K., Roberts LJ. Measurement of lipid peroxidation. *Free radical research*. 1998; 28(6):659-71.
94. Morganti-Kossmann MC., Satgunaseelan L., Bye N. Modulation of immune response by head injury. *Injury*. 2007; 38:1392–1400.
95. Nakamura K., Guizard N., Fonov V.S., Narayanan S., Collins D.L., Arnold, D.L. Jacobian integration method increases the statistical power to measure gray matter atrophy in multiple sclerosis. *NeuroImage: Clinical*. 2014; 4:10-17.
96. Nemecek-Marshall M., MacDonald RC., Franzen JJ., Wojciechowski CL., Fall R. Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development). *Plant Physiology*. 1995; 108(4):1359-68.
97. Nunomura A., Perry G., Pappolla MA., Friedland RP., Hirai K., Chiba S., Smith MA. Neuronal oxidative stress precedes amyloid- $\beta$  deposition in Down syndrome. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2000; 59(11):1011-7.
98. Nurieva O., Kotikova K., Urban P., Pelclova D., Petrik V., Navratil T., Zakharov S. Prevalence, dynamics, and biochemical predictors of optic nerve remyelination after methanol-induced acute optic neuropathy: a 2-year prospective study in 54 patients. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 2016; 147(1):239-49.
99. Nurieva O., Diblík P., Kuthan P., Sklenka P., Meliska M., Bydzovsky J., Heissigerova J., Urban P., Kotikova K., Navratil T., Komarc M. Progressive chronic retinal axonal loss following acute methanol-induced optic neuropathy: four-year prospective cohort study. *American Journal of Ophthalmology*. 2018; 191:100-115.
100. Nurieva O., Hubacek J.A., Urban P., Hlusicka J., Diblík P., Kuthan P., Sklenka P., Meliska M., Bydzovsky J., Heissigerova J., Kotikova K. Clinical and genetic determinants of chronic visual pathway changes after methanol-induced optic neuropathy: four-year follow-up study. *Clinical Toxicology*. 2019; 57(6):387-397.
101. Olson KR. *Poisoning and Drug Overdose*, Sixth edition. 2007;260-261.
102. Onyon LJ, Volans GN. The epidemiology and prevention of paraquat poisoning. *Human Toxicology*. 1987;6(1):19-29.
103. Paasma R., Hovda KE., Hassanian-Moghaddam H., Brahmi N., Afshari R., Sandvik L., Jacobsen D. Risk factors related to poor outcome after methanol poisoning and the relation between outcome and antidotes—a multicenter study. *Clinical Toxicology*. 2012;50(9):823-31.
104. Paasma R., Hovda KE., Jacobsen D. Methanol poisoning and long term sequelae—a six years follow-up after a large methanol outbreak. *BMC Clinical Pharmacology*. 2009; 9(1):5.
105. Paasma R, Hovda KE, Tikkerberi A, Jacobsen D. Methanol mass poisoning in Estonia: outbreak in 154 patients. *Clinical Toxicology*. 2007; 45(2):152-7.
106. Pamplona R., Costantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011; 301(4):R843-63.
107. Parthasarathy NJ., Kumar RS., Manikandan S., Devi RS. Methanol-induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *Journal of Occupational Health*. 2006; 48(1):20-7.

108. Parthasarathy NJ., Kumar RS., Manikandan S., Devi RS. Methanol-induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *Journal of Occupational Health*. 2006; 48(1):20-7.
109. Peng X., Ma J., Chen F., Wang M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food & Function*. 2011; 2(6):289-301.
110. Plog BA., Dashnaw ML., Hitomi E., Peng W., Liao Y., Lou N., Deane R., Nedergaard M. Biomarkers of traumatic injury are transported from brain to blood via the glymphatic system. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(2):518-26.
111. Podda M., Weber C., Traber MG., Packer L. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinones. *Journal of Lipid Research*. 1996; 37(4):893-901.
112. Polidori MC., Mecocci P. Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2002; 4(6):517-22.
113. Riahi Y., Cohen G., Shamni O., Sasson S. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010; 299(6):E879-86.
114. Riahi Y., Cohen G., Shamni O., Sasson S. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010; 299(6):E879-86.
115. Rice-Evans C., Okunade G., Khan R. The suppression of iron release from activated myoglobin by physiological electron donors and by desferrioxamine. *Free Radical Research Communications*. 1989; 7(1):45-54.
116. Roberge RJ., Srinivasa NS., Frank LR., Scorza L., Krenzelok EP. Putaminal infarct in methanol intoxication: case report and role of brain imaging studies. *Veterinary and Human Toxicology*. 1998; 40(2):95-8.
117. Røe O. Methanol poisoning. *Acta Medica Scandinavia* 1946; 126: 1-252.
118. Sagai M., Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress?. *Medical Gas Research*. 2011 Dec;1(1):29.
119. Sanaei-Zadeh H., Zamani N., Shadnia S. Outcomes of visual disturbances after methanol poisoning. *Clinical Toxicology*. 2011;49(2):102-7.
120. Sejersted OM., Jacobsen D. Methanol poisoning. *The Lancet*. 1981; 318(8260):1426.
121. Seme MT., Summerfelt P., Neitz J., Eells JT., Henry MM. Differential recovery of retinal function after mitochondrial inhibition by methanol intoxication. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001;42(3):834-41.
122. Seme MT., Summerfelt P., Neitz J., Eells JT., Henry MM. Differential recovery of retinal function after mitochondrial inhibition by methanol intoxication. *Investigative Ophthalmology & Visual science*. 2001; 42(3):834-41.
123. Semchyshyn HM., Lushchak VI. Interplay between oxidative and carbonyl stresses: molecular mechanisms, biological effects and therapeutic strategies of protection. *Oxidative Stress —Molecular Mechanisms and Biological Effects*. 2012; 25:15-46.
124. Semchyshyn HM. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. *The Scientific World Journal*. 2014; 2014.
125. Shen Q., Loewenstein DA., Potter E., Zhao W., Appel J., Greig MT., Raj A., Acevedo A., Schofield E., Barker W., Wu Y. 2011. Volumetric and visual rating of magnetic resonance imaging scans in the diagnosis of amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2011; 7(4):e101-e108.

126. Shlosberg D., Benifla M., Kaufer D., Friedman A. Blood–brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*. 2010; 6(7):393.
127. Schmitter D., Roche A., Maréchal B., Ribes D., Abdulkadir A., Bach-Cuadra M., Meuli R. An evaluation of volume-based morphometry for prediction of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *NeuroImage: Clinical*. 2015; 7: 7-17.
128. Schneider C., Tallman KA., Porter NA., Brash AR. Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(24):20831-8.
129. Schuhmann MU., Mokhtarzadeh M., Stichtenoth DO., Skardelly M., Klinge PM., Gutzki FM., Samii M., Brinker T. Temporal profiles of cerebrospinal fluid leukotrienes, brain edema and inflammatory response following experimental brain injury. *Neurological Research*. 2003; 25(5):481-91.
130. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*. 2009; 32(12):638-47.
131. Sochocka M., Diniz B.S., Leszek J. Inflammatory response in the CNS: friend or foe?. *Molecular Neurobiology* 2017; 54(10), 8071-8089.
132. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*. 2006; 40(12):1250-8.
133. Stence N., Waite M., Dailey M.E. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 2001; 33(3):256-66.
134. Streit W.J. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroscience Research* 2004; 77(1):1-8.
135. Tephly T.R. The toxicity of methanol. *Life Sci* 1991; 48(11): 1031-1041.
136. Toyokuni S., Miyake N., Hiai H., Hagiwara M., Kawakishi S., Osawa T., Uchida K. The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct. *FEBS Letters*. 1995; 359(2-3):189-91.
137. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*. 2003; 42(4):318-43.
138. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28(12):1685-96.
139. Urban P., Zakharov S., Diblik P., Pelcova D., Ridzon P. Visual evoked potentials in patients after methanol poisoning. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2016; 29(3), 471.
140. Uribarri J., Woodruff S., Goodman S., Cai W., Chen X., Pyzik R., Yong A., Striker GE., Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*. 2010;110(6):911-6.
141. Uttara B., Singh AV., Zamboni P., Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*. 2009;7(1):65-74.
142. Van Acker H., Coenye T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends in Microbiology*. 2017; 25(6):456-66.
143. Vaneckova M., Zakharov S., Klempir J., Ruzicka E., Bezdicek O., Brozova H., Diblik P., Miovsky M., Hubacek JA., Urban P., Ridzon P. Imaging findings after methanol intoxication (cohort of 46 patients). *Neuroendocrinological Letters*. 2015;36(8):737-44.
144. Vaneckova M., Zakharov S., Klempir J., Ruzicka E., Bezdicek O., Liskova I., Diblik P., Miovsky M., Hubacek JA., Urban P., Ridzon P. Methanol intoxication on

- magnetic resonance imaging-case reports. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*. 2014; 77(2):235-9.
145. Viola A., Stvrtina S., Bauer V., Zaviacic M. Morphologic and clinical sequelae of focal ischemic lesions. *Ceskoslovenska Patologie*. 2000; 36(4):140-145
  146. Voigt C., Donat CK., Hartig W., Förchler A., Skardelly M., Stichtenoth D., Arendt T., Meixensberger J., Schuhmann MU. Effect of leukotriene inhibitors on evolution of experimental brain contusions. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2012; 38(4):354-66.
  147. WHO, Methanol Health and Safety Guide. 1997
  148. Williams PA., Coates L., Mohammed F., Gill R., Erskine PT., Coker A., Wood SP., Anthony C., Cooper JB. The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2005; 61(1):75-9.
  149. Wood CA. Poisoning by wood, or methyl alcohol and its preparations as a cause of death and blindness: a supplementary report. *A.R. Elliott Publishing Company*. 1905; 24.
  150. Zakaryan AV., Kazaryan GS., Zakaryan GV., Melkonyan MM., Hovsepyan LM. The study of cytokine content and ganglioside metabolism in experimental brain edema. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2011; 5(1):51-4.
  151. Zakharov S., Kotikova K., Vaneckova M., Seidl Z., Nurieva O., Navratil T., Caganova B., Pelclova D. Acute methanol poisoning: prevalence and predisposing factors of haemorrhagic and non-haemorrhagic brain lesions. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2016a; 119(2):228-38.
  152. Zakharov S., Kurcova I., Navratil T., Salek T., Komarc M., Pelclova D. Is the measurement of serum formate concentration useful in the diagnostics of acute methanol poisoning? A prospective study of 38 patients. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2015a; 116(5):445-51.
  153. Zakharov S., Navrátil T., Pelclova D. Analysis of serum anion gap and osmolal gap in diagnosis and prognosis of acute methanol poisoning: clinical study in 86 patients. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 2015b; 146(5):787-94.
  154. Zakharov S., Navratil T., Pelclova D. Fomepizole in the treatment of acute methanol poisonings: Experience from the Czech mass methanol outbreak 2012-2013. *Biomedical Papers*. 2014a; 158(4):641-9.
  155. Zakharov S., Nurieva O., Kotikova K., Belacek J., Navratil T., Pelclova D. Positive serum ethanol concentration on admission to hospital as the factor predictive of treatment outcome in acute methanol poisoning. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 2017a; 148(3):409-19.
  156. Zakharov S., Nurieva O., Navratil T., Diblik P., Kuthan P., Pelclova D. Acute methanol poisonings: folates administration and visual sequelae. *Journal of Applied Biomedicine*. 2014b; 12(4):309-16.
  157. Zakharov S., Pelclova D., Navratil T., Belacek J., Komarc M., Eddleston M., Hovda KE. Fomepizole versus ethanol in the treatment of acute methanol poisoning: comparison of clinical effectiveness in a mass poisoning outbreak. *Clinical Toxicology*. 2015c; 53(8):797-806.
  158. Zakharov S., Pelclova D., Navratil T., Belacek J., Kurcova I., Komzak O., Salek T., Latta J., Turek R., Bocek R., Kucera C. Intermittent hemodialysis is superior to continuous veno-venous hemodialysis/hemodiafiltration to eliminate methanol and formate during treatment for methanol poisoning. *Kidney International*. 2014c; 86(1):199-207.

159. Zakharov S., Pelclova D., Navratil T., Belacek J., Latta J., Pizar M., Rulisek J., Leps J., Zidek P., Kucera C., Bocek R. Efficiency of acidemia correction on intermittent versus continuous hemodialysis in acute methanol poisoning. *Clinical Toxicology*. 2017b; 55(2):123-32.
160. Zakharov S., Pelclova D., Urban P., Navratil T., Diblik P., Kuthan P., Hubacek JA., Miovsky M., Klempir J., Vaneckova M., Seidl Z. Czech mass methanol outbreak 2012: epidemiology, challenges and clinical features. *Clinical Toxicology*. 2014d; 52(10):1013-24.
161. Zakharov S., Pelclova D., Urban P., Navratil T., Nurieva O., Kotikova K., Diblik P., Kurcova I., Belacek J., Komarc M., Eddleston M. Use of out-of-hospital ethanol administration to improve outcome in mass methanol outbreaks. *Annals of Emergency Medicine*. 2016b; 68(1):52-61.
162. Zakharov S., Kotikova K., Nurieva O., Hlusicka J., Kacer P., Urban P., Vaneckova M., Seidl Z., Diblik P., Kuthan P., Navratil T. Leukotriene-mediated neuroinflammation, toxic brain damage, and neurodegeneration in acute methanol poisoning. *Clinical Toxicology*. 2017c; 21;55(4):249-59.
163. Zhang W., Sato K., Hayashi T., Omori N., Nagano I., Kato S., Horiuchi S., Abe K. Extension of ischemic therapeutic time window by a free radical scavenger, Edaravone, reperfused with tPA in rat brain. *Neurological Research*. 2004; 26(3):342-8.
164. Ziegler SL. The ocular menace of wood alcohol poisoning. *British Journal of Ophthalmology*. 1921; 5(9):411-417.

## 8. SEZNAM TABULEK

1. Vstupní laboratorní data u pacientů v akutní fázi intoxikace (skupina I) a „follow-up“ skupině přeživších, vyšetřovaných dva roky po propuštění z nemocnice (skupina II)
2. Sérové koncentrace leukotrienů měřené během hospitalizace (skupina I) a u „follow-up“ skupiny přeživších (skupina II) dva roky po propuštění
3. Korelace akutních sérových koncentrací markerů lipoperoxidace a akutních sérových koncentrací leukotrienů
4. Sérové koncentrace reaktivních karbonylových sloučenin naměřených v akutní fázi během hospitalizace (skupina I) a u přeživších dva roky po otravě (skupina II)
5. Markery oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřené u pacientů v akutní fázi intoxikace během hospitalizace v nemocnici (skupina I) a ve follow-up skupině (skupina II)
6. Follow-up sérové koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřené dva roky po propuštění z nemocnice u přeživších bez následků versus přeživších s dlouhodobými zraťovými a/nebo CNS následky metanolové otravy
7. Demografická, biochemická a toxicologická data pro „akutní“ skupinu I a pro skupinu II
8. MR volumetrie nucleus caudatus, putamen a globus pallidus u pacientů s nekrozou bazálních ganglií versus u pacientů bez nekrozy bazálních ganglií, skupina I a „Follow-up“ skupina II
9. Korelace výsledků volumetrie nucleus caudatus, putamen a globus pallidus s akutními sérovými koncentracemi markerů oxidačního stresu, zánětu a tloušťky nervových vláken sítnice (RNFL) měřených na OCT ve skupině I
10. Korelace výsledků volumetrie nucleus caudatus, putamen a globus pallidus s akutními sérovými koncentracemi markerů oxidačního stresu, zánětu a tloušťky nervových vláken sítnice (RNFL) měřených na OCT ve skupině II

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ

1. Oxidační stres, schéma
2. Metabolismus metanolu, schéma
3. Tři stádia akutní otravy metanolem
4. Krabicové grafy sérových koncentrací leukotrienů měřených za hospitalizace a u přeživších dva roky po propuštění z nemocnice
5. Dynamika akutních sérových změn koncentrací leukotrienů během sledování v nemocnici u pacientů s akutní otravou metanolem
6. Pokles sérových koncentrací leukotrienů měřených během hospitalizace versus dva roky po otravě
7. Metabolismus kyseliny arachidonové
8. Krabicové grafy sérových koncentrací markerů lipoperoxidace měřených za hospitalizace a u přeživších dva roky po propuštění z nemocnice
9. Sérové koncentrace markerů lipoperoxidace a leukotrienů měřené během hospitalizace a dva roky po propuštění z nemocnice, u přeživších versus zemřelých během hospitalizace, u přeživších s a bez následků
10. Dynamika změn sérové koncentrace markerů lipoperoxidace u pacientů hospitalizovaných s metanolovou intoxikací během hospitalizace v nemocnici
11. Pokles sérových koncentrací markerů lipoperoxidace měřených během hospitalizace versus koncentrace měřené dva roky po propuštění z nemocnice
12. Neuroinflamace, schéma
13. Vznik biologicky aktivních aldehydů z kyseliny arachidonové neenzymatickou cestou
14. Krabicové grafy sérových koncentrací markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřených za hospitalizace a u přeživších dva roky po propuštění z nemocnice
15. Dynamika změn koncentrací akutních sérových markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů během observace v nemocnici u pacientů s metanolovou otravou
16. Změny sérových koncentrací markerů oxidativního poškození nukleových kyselin a proteinů měřených během hospitalizace versus koncentrací měřených 2 roky po propuštění
17. Korelace mezi objemem putamen a tloušťkou nervových vláken sítnice
18. MR snímek mozku u pacienta s otravou metanolem
19. Riziko špatné prognózy terapie v závislosti na administraci etanolu před přijetím pacienta do zdravotnického zařízení.

## 10. SEZNAM ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace v časopisech s impakt faktorem: **12**

Z toho první autor: **5**

H-index: **3**

Souhrnný impakt faktor: **36,616**

Práce s nejvyšším IF jako první autor:

**Hlusicka, J.**, Loster, T., Lischkova, L., Vaneckova, M., Seidl, Z., Diblik, P., Kuthan, P., Urban, P., Navratil, T., Kacer, P. and Zakharov, S., 2018. Role of activation of lipid peroxidation in the mechanisms of acute methanol poisoning. *Clinical Toxicology*, 56(10), pp.893-903. **IF 4,398**

---

1. **Hlusicka, J.**, Loster, T., Lischkova, L., Vaneckova, M., Seidl, Z., Diblik, P., Kuthan, P., Urban, P., Navratil, T., Kacer, P. and Zakharov, S., 2018. Role of activation of lipid peroxidation in the mechanisms of acute methanol poisoning. *Clinical Toxicology*, 56(10), pp.893-903. **IF 4,398**
2. **Hlusicka, J.**, Loster, T., Lischkova, L., Vaneckova, M., Diblik, P., Urban, P., Navratil, T., Kacer, P., Kacerova, T. and Zakharov, S., 2019. Markers of nucleic acids and proteins oxidative damage in acute methanol poisoning. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 150(3), pp.477-487. **IF 1,501**
3. **Hlusicka, J.**, Loster, T., Lischkova, L., Vaneckova, M., Diblik, P., Urban, P., Navratil, T., Kacer, P., Kacerova, T. and Zakharov, S., 2019. Reactive carbonyl compounds, carbonyl stress, and neuroinflammation in methyl alcohol intoxication. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 150(9), pp.1723-1730. **IF 1,501**
4. **Hlusicka, J.**, Mana J., Vaneckova, M., Kotikova, K., Diblik, P., Urban, P., Navratil, T., Marechal, B., Kober, T., Zakharov, S. 2020. MRI-based brain volumetry as a biomarker of outcomes in acute methanol poisoning. *Neurotoxicology* 2020 (submitted). **IF 3,263**
5. **Hlusicka, J.**, Veisova, E., Ullrych, M., Kubecek, J., Navratil, T. and Zakharov, S., 2017. Serum calcium and phosphorus concentrations and the outcome of calciphylaxis treatment with sodium thiosulfate. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 148(3), pp.435-440. **IF 1,501**
6. Zakharov, S., Kotikova, K., Nurieva, O., **Hlusicka, J.**, Kacer, P., Urban, P., Vaneckova, M., Seidl, Z., Diblik, P., Kuthan, P. and Navratil, T., 2017. Leukotriene-mediated neuroinflammation, toxic brain damage, and neurodegeneration in acute methanol poisoning. *Clinical Toxicology*, 55(4), pp.249-259. **IF 4,398**



7. Zakharov, S., **Hlusicka, J.**, Nurieva, O., Kotikova, K., Lischkova, L., Kacer, P., Kacerova, T., Urban, P., Vaneckova, M., Seidl, Z. and Diblik, P., 2018. Neuroinflammation markers and methyl alcohol induced toxic brain damage. *Toxicology Letters*, 298, pp.60-69. **IF 3,858**
8. Nurieva, O., Hubacek, J.A., Urban, P., **Hlusicka, J.**, Diblik, P., Kuthan, P., Sklenka, P., Meliska, M., Bydzovsky, J., Heissigerova, J. and Kotikova, K., 2019. Clinical and genetic determinants of chronic visual pathway changes after methanol-induced optic neuropathy: four-year follow-up study. *Clinical Toxicology*, 57(6), pp.387-397. **IF 4,398**
9. Zakharov, S., Rulisek, J., **Hlusicka, J.**, Kotikova, K., Navratil, T., Komarc, M., Vaneckova, M., Seidl, Z., Diblik, P., Bydzovsky, J. and Heissigerova, J., 2019. The impact of co-morbidities on a 6-year survival after methanol mass poisoning outbreak: possible role of metabolic formaldehyde. *Clinical Toxicology*, pp.1-13. **IF 4,398**
10. Lischkova, L., Pelclova, D., **Hlusicka, J.**, Navratil, T., Vlckova, S., Fenclova, Z., Dvorackova, S., Popov, A., Michalcova, A., Marek, I. and Mikuska, P., 2019. Detection and identification of engineered nanoparticles in exhaled breath condensate, blood serum, and urine of occupationally exposed subjects. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 150(3), pp.511-523. **IF 1,501**
11. Lischková, L., Pelclová, D., **Hlušička, J.**, Kadlec, V., Zakharov, S. and Navrátil, T., 2018. Severe suicidal self-poisoning with massive dose of potassium ferricyanide (III): hyperkalemia but not free cyanide may cause death. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 149(9), pp.1647-1651. **IF 1,501**
12. Rulisek, J., Waldauf, P., Belohlavek, J., Balik, M., Kotikova, K., **Hlusicka, J.**, Vaneckova, M., Seidl, Z., Diblik, P., Bydzovsky, J. and Heissigerova, J., 2020. Health-related quality of life determinants in survivors of a mass methanol poisoning outbreak: six-year prospective cohort study. *Clinical Toxicology*, pp.1-11. **IF 4,398**

## **11. PŘÍLOHY: KOPIE HLAVNÍCH ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ**